

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2001-204495
(43)Date of publication of application : 31.07.2001

(51)Int.Cl.

C12Q 1/37
C12Q 1/26
G01N 33/68
G01N 33/72

(21)Application number : 2000-020224

(71)Applicant : ASAHI KASEI CORP

(22)Date of filing : 28.01.2000

(72)Inventor : TAKATSUMA TAKUJI

(54) METHOD FOR ASSAYING PROPORTION OF SACCHARIFIED PROTEIN

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method for readily assaying the ratio of a saccharified protein to proteins in the same reaction vessel.

SOLUTION: This method for assaying the proportion of the saccharified protein comprises carrying out the following steps (1) to (3) in the same reaction vessel: (1) determination of the protein in the test solution; (2) protease-treatment of the protein; and (3) determination of the saccharified protein by using an enzyme acting on a saccharified amino acid. The reaction pH and the combination of coloring dyes are optimized when a protein-determining reagent and a saccharified protein-determining reagent are used, and further the reaction is regulated so that the color change of the protein-determining reagent caused by the action of ≥ 500 PU/ml protease may not affect the determination of the saccharified protein. The ratio of the saccharified protein to the proteins in the serum, the plasma or the whole blood can be accurately, readily and inexpensively determined.



*** NOTICES ***

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.**** shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS**[Claim(s)]**

[Claim 1]measuring method [of a rate]: to protein of glycated protein performing the following process of 1-3 in a reaction-of-identity tub -- one -- the fixed quantity 2 of protein in sample liquid -- the protease treatment 3 of this protein -- saccharification -- saccharification using an enzyme which acts on amino acid -- a fixed quantity of amino acid [Claim 2]protease -- a globulin ingredient -- a method according to claim 1 of making it act under existence of alternative inhibitor.

[Claim 3]A method according to claim 1 or 2 of performing a proteinic fixed quantity and a fixed quantity of glycated protein with an identical wavelength.

[Claim 4]A way according to any one of claims 1 to 3 protein is albumin or hemoglobin.

[Claim 5]A way according to any one of claims 1 to 4 concentration of protease is 500 PU(s)/more than ml.

[Claim 6]A way according to any one of claims 3 to 5 albumin fixed-quantity coloring matter is 2-(4'-hydroxybenzeneazo) benzoic acid, and pH at the time of an albumin fixed quantity is pH4.0-9.0, and pH at the time of a glycated albumin fixed quantity is pH5.0-10.0.

[Claim 7]A way according to any one of claims 3 to 5 albumin fixed-quantity coloring matter is bromocresol green, and pH at the time of an albumin fixed quantity is less than pH5.5, and pH at the time of a glycated albumin fixed quantity is pH5.0-5.5.

[Claim 8]A way according to any one of claims 3 to 5 albumin fixed-quantity coloring matter is bromocresol purple, and pH at the time of an albumin fixed quantity is 4.5-7.5, and pH at the time of a glycated albumin fixed quantity is 5.0-7.5.

[Claim 9]A way according to any one of claims 3 to 5 a surface-active agent which contains a sulfuric acid group at least, a nonionic surfactant, and/or both ionic surfactants are added at the time of a fixed quantity of hemoglobin, and hemoglobin and pH at the time of a glycosylated hemoglobin fixed quantity are 5.0-9.5.

[Claim 10]a protein quantification reagent, protease, and saccharification -- a constituent for rate measurement to protein of glycated protein containing an enzyme which acts on amino acid.

[Claim 11]a protein quantification reagent, protease, a globulin alternative protease inhibitor, and saccharification -- a constituent for rate measurement to protein of glycated protein containing an enzyme which acts on amino acid.

[Claim 12]coloring matter for protein quantification, and saccharification -- the constituent according to claim 10 or 11, wherein an absorption maximum wavelength of coloring matter for protein fixed quantity is in an identical wavelength or its neighborhood.

[Claim 13]The constituent according to claim 10 to 12 whose protein is albumin or hemoglobin.

[Claim 14]The constituent according to claim 13 whose albumin fixed-quantity coloring matter is 2-(4' hydroxybenzeneazo) benzoic acid and whose pH of an albumin assaying reagent is pH4.0-9.0.

[Claim 15]The constituent according to claim 13 whose albumin fixed-quantity coloring matter is bromocresol green and whose pH of an albumin assaying reagent is the pH 5.5 following.

[Claim 16]The constituent according to claim 13 whose albumin fixed-quantity coloring matter is bromocresol purple and whose pH of an albumin assaying reagent is pH4.5-7.5.

[Claim 17]The constituent according to claim 13 whose pH of a hemoglobin quantitation reagent a hemoglobin quantitation reagent contains a surface-active agent which contains a sulfuric acid group

at least, a nonionic surfactant, and/or both ionic surfactants, and is pH5.0-9.5.

[Translation done.]

*** NOTICES ***

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.**** shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

DETAILED DESCRIPTION**[Detailed Description of the Invention]****[0001]**

[Field of the Invention]This invention relates to the determination method and the constituent for fixed quantity of a rate to protein of glycated protein. It is related with the rate assay and the constituent for fixed quantity to protein of glycated protein useful in simplicity, quickness, and the clinical biochemistry inspection field using an enzyme in detail.

[0002]

[Description of the Prior Art]Measurement of glycated protein is dramatically important on diabetic diagnosis and *****, The glycosylated hemoglobin reflecting the average blood sugar level for past about one to two months, the glycated albumin reflecting the average blood sugar level of about two weeks of past, fructosamine that is general terms for the glycated protein in which the reduction ability in a blood serum is shown, etc. are measured daily. Especially, glycated albumin and glycosylated hemoglobin have little individual difference, in order for the value to be shown by the glycated protein rate per protein, and since it is not influenced by protein concentration, measurement is daily performed for the purpose of diabetic screening and symptoms management.

[0003]As assay of glycated protein, they are the following (a). The method and enzymatic process of – (e) are known.

- (a) Chromatography method [J.Clin.Chem.Clin.Biochem.19:81–87 (1981)] .
- (b) Electrophoresis method [Clin.chem.26:1958–1602 (1980)] .
- (c) Immunization [JCCLA 18:620 (1993)] .
- (d) A measuring method of fructosamine using the reduction nature of alkaline glycated protein [Clin.Chem.Acta 127:87–95 (1982)] .
- (e) How to use thiobarbituric acid [Clin.Chem.Acta 112:197–204 (1981)] .

Above (a) There are many problems, like the method of (b) needs operativity, accuracy, and an expensive dedicated device, and the method of the above (c) is not necessarily accurate, and it is the above (d). The method of (e) was influenced by the coexistent substance in a sample, and had a problem in respect of singularity.

[0004]it is high-precision and simple and cheap determination methods involve enzymatic process -- the following -- (f) – the method of (i) is known.

(f) How to measure fructosamine in pronase treatment–FURUKU tosyl amine DEGURIKAZE (JP,6-46846,A).

(g) How to perform protease treatment and detect in FURUKU tosyl amino acid oxidase (JP,H5-192193,A).

(h) How to detect in lysine residue isolation reagent–epsilon-alkyl RIJINAZE (JP,H2-195900,A).

(i) How to detect with the redox enzyme which makes a lysine residue isolation reagent–CH-OH radical a hydrogen donor, and makes NAD and/or NADP a hydrogen donor (JP,H2-195899,A).

[0005]this invention persons' group -- saccharification -- the transformed pure microorganism was created on the parenchyma which produces the enzyme which acts on amino acid, and the method (JP,10-201473,A) of producing efficiently FURUKU tosyl amine oxidase with high thermal stability and reactivity has been developed. However, the enzymatic process needed to compute the glycated protein rate by **(ing) simplicity and the fixed-quantity value which quantified the total amount of

this protein separately and was obtained with enzymatic process while it was cheap and exact, and there was no example which performed a proteinic fixed quantity and a fixed quantity of glycated protein in the reaction-of-identity tub until now. Since the globulin ingredient of which it is known that the quantity will change with various illnesses a lot exists in large quantities in blood, this invention persons, The influence of a globulin ingredient was avoided and the method (Japanese Patent Application No. No. 231259 [11 to]) of measuring selectively glycated protein in protein other than a globulin ingredient has been developed.

[0006]

[Problem(s) to be Solved by the Invention]The purpose of this invention is to provide the constituent for fixed quantity for using it for the rate determination method of glycated protein to useful protein in a clinical biochemistry inspection, and its fixed quantity. saccharification of this protein in which a proteinic fixed quantity and enzymatic process were used for the purpose of this invention in more detail -- it is in providing the method of quantifying the rate of glycated protein over protein simple, and the constituent for fixed quantity used for the fixed quantity by performing a fixed quantity of a thing by a reaction-of-identity tub.

[0007]

[Means for Solving the Problem]in order to attain the above-mentioned purpose -- a proteinic fixed quantity, protease treatment of this protein, and saccharification -- what is necessary is just to perform a fixed quantity of amino acid in a reaction-of-identity tub However, if protease is made to act on a point that conditions which quantify protein differ from conditions (for example, pH of measurement, wavelength, etc.) which quantify glycated protein, and proteinic fixed-quantity liquid, A point which coloring of the protein fixed-quantity coloring matter changes, and produces big influence in measurement of continuing glycated protein, a protein quantification reagent -- saccharification, in order to quantify a rate of a point violently colored by protein fixed-quantity conditions, glycated albumin, or glycosylated hemoglobin, saccharification in albumin in blood, or hemoglobin -- it was difficult to measure both correctly in a reaction-of-identity tub only in combination of publicly known art simply from a point which needs to measure only a thing selectively.

[0008]Then, one-wave continuous measurement is possible for this invention persons by optimizing wholeheartedly combination of coloring matter used for protein quantification, and coloring matter used for a glycated protein fixed quantity as a result of examination, And a thing for which coloring change of protein concentration measurement by a protease action can be avoided by adjusting conditions on which protease is made to act, And it found out that unusual coloring of a protein color reagent was avoidable by optimizing a kind of coloring matter for protein quantification, and pH of glycated protein detection. By combining with a method (Japanese-Patent-Application-No. 11-231259 item) of avoiding influence of a globulin ingredient which this invention persons have developed, saccharification of albumin in blood, and hemoglobin -- it found out that influence of a globulin ingredient was made small and a rate could be measured, and resulted in completion of this invention.

[0009]That is, this invention is performed in order to attain such a purpose, and it is used for rate measurement of glycated protein to protein in a clinical biochemistry inspection as a useful determination method and a constituent for fixed quantity. ;1 about a glycated protein rate measuring method, wherein this invention performs the following process of 1-3 in a reaction-of-identity tub A fixed quantity of protein in sample liquid, 2) the protease treatment 3 of this protein -- saccharification -- saccharification using an enzyme which acts on amino acid -- it is good to ** a glycated protein fixed-quantity value with a protein quantification value, and to compute a rate of glycated protein over protein in fixed-quantity this invention of amino acid. this invention -- a protein quantification reagent, protease, and saccharification -- glycated protein containing an enzyme which acts on amino acid -- it is comparatively related with a constituent for fixed quantity.

[0010]It explains in more detail about composition and a desirable gestalt of this invention. As long as sample liquid used as a measuring object of this invention is sample liquid containing glycated protein at least, what kind of thing may be used for it, but a constituent of blood, for example, whole blood, a corpuscle, red corpuscles, laked blood, a blood serum, plasma, or urine is mentioned preferably. As long as it is useful protein on a clinical laboratory test as protein used as a measuring object of this invention, which protein may be measured, but it is protein which exists in blood preferably, for

example, albumin or hemoglobin is mentioned.

[0011]As long as a determination method of protein which is the target of this invention is the method of measuring target protein correctly, what kind of method may be used for it. For example, when target protein is albumin, as long as it is the method of measuring publicly known albumin, what kind of method may be used. In such a method, for example Bromcresol green (it abbreviates to BCG below.), Bromcresol purple (it omits the following BCP.), a bromophenol blue (it abbreviates to BPB below.), albumin, such as a Methyl Orange (it abbreviates to MO below.), or 2-(4'-hydroxybenzeneazo) benzoic acid (it omits the following HABA.), -- a method of using specific coloring matter, etc. are mentioned. When target protein is hemoglobin, as long as it is the method of measuring publicly known hemoglobin, what kind of method may be used further again. such a method -- METO -- the MOGURBIN method, a cyanmethemoglobin method, and aza -- ide -- the methemoglobin method, the green chromophoric group forming method, or an oxyhemoglobin method is mentioned. The green chromophoric group forming method is the method of making hemoglobin react to a green chromophoric group formation reagent, and forming a stable output (green chromophoric group), and a green chromophoric group is the British patent *****. It has the same absorption spectrum as alkaline hematin D-575 described by No. 2052056.

[0012]If protease which can be used for this invention acts effective in protein used as an object contained in sample liquid, what kind of thing may be used, for example, an animal, vegetation, protease from microorganism, etc. will be mentioned. A concrete example is shown below. However, these are only one example and are not limited at all. As an example of protease of animal origin, elastase (Elastase), Trypsin (Tripsin), the chymotrypsin (Chymotripsin), Pepsin (Pepsin), cow pancreas protease, the cathepsin (Cathepsin), Calpain (Calpain), the protease type I, and -XX (above) Sigma company make, the aminopeptidase M (AminopeptidaseM), carboxypeptidase A (CarboxypeptidaseA) (above, Boehringer Mannheim make), pancreatic (Pancreatin: made by Wako Pure Chem), etc. are mentioned. As an example of protease of vegetable origin, the kallikrein (Kallikrein), Ficin (Ficin), papain (Papain), chymopapain (Chimopapain), bromelain (Bromelain) (above, sigma company make), the papain W-40, the bromelain F (above, the Amano Pharmaceuticals company make), etc. are mentioned.

[0013]As an example of protease from microorganism, it is following (1). - (14) is mentioned. Bacillus (Bacillus) group origin protease; (1) Subtilisin (Subtilisin), The protease type VIII, -IX, -X, -XV, and -XXIV, -XXVII, -XXXI (above, sigma company make), thermolysin (termolysin) (above) The Wako Pure Chem make, the orientase 90N, -10NL, and -22BF, -Y, -5BL, NUKUREISHIN (above, the Hankyu bio-industry company make), A pro leather, the protease N, -NL, -S "Amano" (above) The Amano Pharmaceuticals company, GODO-BNP, -BAP (above, joint **** Co. refining), Pro ****-A, -P, DESUKIN, DEPIREISU, BIOSOKU, SAMOAZE (above) Made in Daiwa Chemicals, TOYOCHIMU NEP (made by Toyobo Co., Ltd.), and newt RAZE, Rust and NAZE, Durazym, a bio-feeding pro, alcalase, [S] NUE, PIRAZE, a clear lens pro, EBARAZE, and Novozym FM, Novo Laon (above, Novo Nordisk bio-industry company make), Enzylon NBS, -SA (above, Rakuto Kasei Industrial CO., LTD. make), and alkaline protease GL440 and Opti -- clean -- M375, [and]-L1000, -ALP440 (above, harmony fermentation company make), nagarse (Nagarse), BIOPURAZE APL-30, SP-4FG, XL-416F, and AL-15FG (above) the Nagase Brothers Seikagaku make, AROAZE AP-10, and the protease YB -- (the above --) by Yakult Pharmaceutical Ind. Co., Ltd., Collo *****-N, and -7089, Veron W (above, the Higuchi company company make), KIRAZAIMU P-1 (made by Roche A.G.), etc.

[0014]Aspergillus (Aspergillus) origin protease; (2) The protease type XIII. - XIX, -XXIII (above, sigma company make), Sumizyme -MP, -AP, -LP gas, -FP, -LPL, enzyme P-3 (above) The Shin Nippon Kagaku Industries make, the orientase 20A, -ONS, -ON5 and Tetradze S (above, the Hankyu bio-industry company make). The newlase A, protease A, -P, -M "Amano" (above) The Amano Pharmaceuticals company, IP enzyme, Molsin F, and AO protease (above) The KIKKOMAN CORP. make, pro ****-F, -FN, -FA (above, made in Daiwa Chemicals), Denapsin 2P, Dinah *****-SA-7, -AP, and DENAZAIMU AP (above) Nagase Brothers Seikagaku make, protease YP-SS, punch *****-NP-2, -P (above, Yakult make), SAKANAZE (made by Kaken Pharma Co., Ltd.), and flavor ZAIMU (made by the Novo Nordisk bio-industry company), Veron PS (made by the Higuchi company company), etc.

[0015](3) RIZOPASU (Rhizopus) origin protease; the protease type XVIII (made by a sigma company),

the peptidase R, the newlase F (above, the Amano Pharmaceuticals company make), XP-415 (made by Nagase Brothers Seikagaku), etc.

(4) Penicillium (Penicillium) origin protease ;P D enzyme (made by KIKKOMAN CORP.) etc.

(5) Streptomyces (Streptomyces) origin Protea; protease type XIV ; The another name Pronase. - XXI (above, sigma company make), ***** AS, -AF (above, Kaken Pharma Co., Ltd. make), TASHINAZE (made by a harmony fermentation company), alkalofilicproteinase (made by Toyobo Co., Ltd.), etc.

(6) Staphylococcus (Staphylococcus) origin protease; protease type XVII (made by a sigma company) etc.

[0016](7) Clostridium (Clostridium) origin protease; -- clostripain (Clostripain) -- nonspecific Neutral protease (nonspecificnatorial proteinase) (above, sigma company make) etc.

(8) RISOBAKUTA (Lysobacter) origin protease;; proteinase Lys-C (made by a sigma company), etc.

(9) Grifola (Grifola) origin protease; metalaw proteinase (Metalloemdopeputidase; made by a sigma company) etc.

(10) Yeast (Yeast) origin protease; the proteinase A (proteinaseA; made by a sigma company), carboxypeptidase Y (CarboxypeptidaseY; made by Boehringer Mannheim), etc.

[0017](11) TORICHIRACHIUMU (Tritirachium) origin Protea; proteinase K (ProteinaseK; made by a sigma company) etc.

(12) Thermus (Thermus) origin protease; aminopeptidase T (AminopeptidaseT; made by Boehringer Mannheim) etc.

(13) Pseudomonas (Pseudomonas) origin protease;; proteinase Asp-N (Endoproteinase Asp-N; made by Wako Pure Chem), etc.

(14) Achromobacter (Achromobacter) origin protease; lysyl-proteinase (Lysylendopeptidase), achromopeptidase (above, Wako Pure Chem make), etc.

[0018]Since an operation of as opposed to the Homo sapiens albumin in protease of Bacillus and Streptomyces from microorganism is large when protein which is a measuring object is albumin, it is desirable, Since an operation of as opposed to human hemoglobin in protease of Bacillus, an Aspergillus, Streptomyces, and TORICHIRACHIUMU group origin is large when there is protein which is a measuring object by hemoglobin, it is desirable.

[0019]An activity measurement method of protease which can be used for this invention is shown below.

It is 30 ** and 1 at a measuring condition of <<activity measurement method [of protease] >> following. Protease activity which shows coloration equivalent to tyrosine of 1microg is displayed as 1PU (proteolytic Unit) between parts.

< substrate > 0.6% Milk casein (made by Merck Co.)

It dilutes to <enzyme solution> 10PU – 20PU. < enzyme diluted solution > 20mM acetic acid buffer solution pH7.5 1mM calcium acetate 100mM sodium chloride <reaction stop solution> 0.11M trichloroacetic acid 0.22M sodium acetate 0.33M acetic acid[0020]A <operation> protease solution is dissolved in enzyme diluted solution so that it may be set to ten to 20 PU/ml, 1 ml of this liquid is taken in a test tube, and it warms at 30 **. 5 ml of substrate solutions beforehand warmed at 30 ** are added, 5 ml of reaction stop solutions after 10 minutes are added correctly, and a reaction is suspended. Continue 30 ** of warming then for 30 minutes, precipitate is made to condense, it filters through the Oriental filter paper N0.131 (9 cm), and a filtrate is obtained. 1 ml of protease solutions are taken in a test tube, and it warms at 30 **, and 5 ml of reaction stop solutions are added first, it continues, and blank measurements are substrate solutions. Condensation and filtration are performed like the 5 ml addition-back. filtrate [] -- 2 ml -- 0.55M sodium carbonate solution [] -- 5 ml3 -- double dilution Folin's reagent [] -- adding 1 ml -- after [] 30 ** and a 30-minute reaction -- an absorbance of 660 nm is measured. It asks for an absorbance variation and deltaA which deducted an absorbance of blank measurements from an absorbance which performed enzyme actions, and enzyme activity is searched for from an operation standard curve created independently.

[0021]The <standard operation curvilinear creating method> deltaA obtained by creating an enzyme solution which diluted an enzyme solution adjusted to about 50 PU(s)/ml, and had a series of two to 50 PU/ml dilution magnification, and performing the above-mentioned operation is plotted on a

vertical axis, and a dilution multiple is plotted on a horizontal axis. Let what dissolved L-tyrosine in 0.2N chloride on the other hand at 0.01% of concentration, and 10 ml of 0.2N chloride added to the 1 ml be a standard tylosin solution (9.09 microg/ml tyrosine concentration). deltaA obtained by performing the above-mentioned measurement operation, respectively about 2 ml of standard tylosin solutions and 2 ml of 0.2N chloride is equivalent to tyrosine 18.2μg. This deltaA is taken to the aforementioned graph up, an altitude is taken down from that point to a horizontal axis, and an intersection with a horizontal axis is equivalent to 10 PU(s)/ml.

[0022] saccharification which can be used for this invention -- as an enzyme which acts on amino acid, saccharification generated from glycated protein contained in sample liquid by operation of said protease -- amino acid or saccharification -- it acts effective in peptide, and as long as it is an enzyme which can measure glycated protein substantially, what kind of thing may be used. For example, in making glycated albumin into a measuring object, saccharification which saccharified in epsilon-amino group -- saccharification which saccharified in alpha-amino group when an enzyme which acts on amino acid or peptide was preferred and made glycosylated hemoglobin a measuring object -- an enzyme which acts on amino acid or peptide is preferred.

[0023] saccharification which saccharified in epsilon-amino group -- as an example of an enzyme which acts on amino acid, the Gibberella (Gibberella) group or an Aspergillus (Aspergillus) group (IFO-6365 and -4242.) [for example,] -- Origin fructosamine oxidase, such as 5710, Candida (Candida) group origin FURUKU tosyl amine DEGURIKAZE, a penicillium (Penicillium) group (IFO-4651 and -6581.) [for example,] -- Origin FURUKU tosyl amino acid dialytic ferments, such as 7905, -5748, -7994, -4897, and -5337, a fusarium (Fusarium) group (IFO-4468 and -4471.) [for example,] -- The origins, such as 6384, -7706, -9964, -9971, -31180, and -9972, the Acremonium (Acremonium) group origin, or DEBARIOMAIZESU (Debaryomyces) group origin keto amine oxidase is mentioned.

[0024] saccharification which saccharified in alpha-amino group -- as an example of an enzyme which acts on amino acid or peptide, saccharification which saccharified in the above-mentioned epsilon-amino group -- an enzyme which acts on amino acid or peptide, and an enzyme of the Corynebacterium (Corynebacterium) origin, [mention and] saccharification which saccharified in alpha-amino group -- an enzyme of the Corynebacterium origin is mentioned as an example of an enzyme which acts on amino acid or peptide specifically.

[0025] saccharification which saccharified in alpha-amino group and epsilon-amino group -- it acts on amino acid or peptide, and modified type fructosamine oxidase (R-FOD; made by Asahi Chemical Industry Co., Ltd.) of a gene is mentioned as an example of an enzyme which has activity sufficient also in the state where it was made to coexist with protease.

[0026] saccharification -- the activity of an enzyme which acts on amino acid is measured by a following method.

< -- < -- saccharification -- the activity measurement method >> <presentation of reaction mixture>
50mM tris-buffers pH7.50.03% 4-aminoantipyrine (it abbreviates to 4-AA below.) of an enzyme which acts on amino acid ; Wako Pure Chem make

0.02% Phenol (made by Wako Pure Chem)

4.5U/ml peroxidase (it abbreviates to POD below.) ; Sigma company make

1.0mM alpha- carbobenzoxy epsilon-D - FURUKU tosyl L- Lysine or FURUKU tosyl valine (it bases and refined [compounded and] to a method of HASHIBA and others.) Hashiba H, J.Agric.Food Chem.24:70, 1976. It abbreviates to ZFL below.

[0027] 1 ml of the above-mentioned reaction mixture is put into a small test tube, and it is 37 **-5. After carrying out preliminary warming between parts, 0.02 ml of enzyme liquid diluted suitably is added and stirred, and a reaction is started. For exactly 10 minutes, after a reaction, 0.5% of SDS [2 ml of] is added, a reaction is suspended, and an absorbance with a wavelength of 500 nm is measured (As). 0.02 ml of distilled water is used instead of enzyme liquid as blank, the same operation is performed, and an absorbance is measured (Ab). Enzyme activity is searched for from absorption difference (As-Ab) of an absorbance (As) of these enzyme actions, and an absorbance (Ab) of a blank test. Independently, using a standard solution of hydrogen peroxide, relation between an absorbance and generated hydrogen peroxide is investigated, and it is 37 **-1 beforehand. The amount of enzymes which generates hydrogen peroxide of 1microm between parts is defined as 1U. A formula is shown below.

Enzyme activity (U/ml) = a dilution ratio of a (As-Ab)x2.32x enzyme [0028]a globulin ingredient which can be used for this invention -- an alternative protease inhibitor, To for example, sample liquid containing protein other than a globulin ingredient like a constituent of blood, and a globulin ingredient. protease -- a globulin ingredient -- alternative -- carrying out protease inhibitor existence bottom operating -- mainly -- saccharification from protein other than a globulin ingredient -- a globulin ingredient which may produce a substrate of an enzyme which acts on amino acid -- as long as it is an alternative protease inhibitor, what kind of thing may be used. A metal ion, protein A, the protein G, etc. are mentioned as the example.

[0029]As a metal ion, a metal ion of a transition metal, III fellows, and group IV is preferred, for example, As a transition metal ion, zinc, nickel, iron, copper, and cobalt ion are more preferred, aluminum and gallium ion are more preferred as group III metal ion, and tin and a lead ion are more preferred as a group IV metal ion. When generation of precipitate by metaled toxicity and an interaction with a blood serum, etc. are furthermore taken into consideration, aluminum or nickel ion is the most preferred. What is necessary is just to use solution of a salt with the metal ion discharge capability, for example, in order these metal ions are independent, or to combine and use and to add a metal ion.

[0030]a decomposition reagent of protein which used a protein quantification reagent and protease about liquid composition in a determination method of a glycated protein rate of this invention, and generated saccharification -- saccharification which performs a fixed quantity of amino acid or peptide -- what is necessary is just to combine suitably so that an amino acid assaying reagent can be used in a reaction-of-identity tub

[0031]The protein quantification reagent presentation which can be used for this invention should just use a publicly known protein quantification reagent. In order to quantify albumin For example, said BCG, BCP, and BPB, Albumin fixed-quantity coloring matter, such as MO, a tiba kuron blue derivative, or HABA, can be used, a case where HABA is used -- pH3.0-10.0 -- in pH4.0 - 9.0 preferably, 0.001 -- what is necessary is for what is necessary to be just to use it by 0.01 to 1% of concentration preferably, to measure a 480-550-nm absorbance variation 10%, and just to compare with coloring of a reference standard of known concentration In using BCP similarly, pH 4.0-8.0, a surface-active agent which presses down coloring in pH 4.5-7.5 preferably, BriJi35 [for example,] etc. -- 0.01 to 5% -- what is necessary is for what is necessary to be just to use it at 0.0005 to 0.1% preferably, to measure an absorbance variation near 600 nm 0.0001 to 0.2% under 0.05 to 1% of coexistence, preferably, and just to compare with coloring of a reference standard of known concentration

[0032]for example, for the purpose of quantifying hemoglobin. To a publicly known hemoglobin quantitation method, for example, said METO, to the MOGUROBIN method and SHIAMMETO The MOGUROBIN method, In being able to use the MOGUROBIN method etc. to aza IDOMETO to the MOGUROBIN method, the green chromophoric group forming method, or oxy and using the methemoglobin method, For example, in using a cyanmethemoglobin method, oxidizers, such as potassium ferricyanide, for example, cyanide ion, such as potassium cyanide, aza -- ide -- a case where the methemoglobin method is used -- for example, aza, such as sodium azide, -- ide, When using the green chromophoric group forming method, **** which adds green chromophoric group formation reagents, such as a nonionic surfactant, by a publicly known method is good, and when using an oxyhemoglobin method, a sample is diluted with distilled water, for example, and ***** is [after changing into MOGUROBIN] good in 540-nm absorption to oxy. It is desirable, when a surface-active agent, for example, a surface-active agent which has a sulfuric acid group at least, a nonionic surfactant, and/or both ionic surfactants are preferably added by 0.001 to 10% of concentration in order to prevent the denaturation of hemoglobin.

[0033]As a decomposition reagent presentation of protein which can be used for this invention, if pH and protease concentration are determined that a reaction will advance efficiently in consideration of optimal pH of protease to be used and it is required -- an after that globulin ingredient -- what is necessary is to prepare suitably and just to add an alternative protease inhibitor so that it may become effective concentration

[0034]For example, in said protease type XXVII (made by a sigma company), proteolysis activity of pH is strong in the seven to 10 neighborhood, and pH of a reaction can choose 7-10. There should just

be protease addition concentration by concentration which may fully disassemble glycated protein in sample liquid during reaction time actually used, 500 to 500,000 PU/its ml is preferred, and 1000 to 100,000 PU/its ml is more preferred. further -- a globulin ingredient, when using Al ion as an alternative protease inhibitor, Since 0.05 or more mM of muddiness at the time of sample liquid addition become still more desirable notably from 2 or more mM preferably in 0.3 or more mM whose protease action to a globulin ingredient is lost substantially, 0.05mM – 2mM are preferred, and 0.1mM – 1mM are still more preferred.

[0035] saccharification which can be used for this invention -- saccharification used about an amino acid assaying reagent presentation -- choosing pH in consideration of optimal pH of an enzyme which acts on amino acid, so that a reaction may advance efficiently -- after that and saccharification -- what is necessary is just to determine the amount of enzymes which acts on amino acid For example, when using R-FOD (made by Asahi Chemical Industry Co., Ltd.), a field which has activity is as large as pH5.0 – 11, and pH of a reaction can choose 5.0 – 11. the inside of reaction mixture for which enzyme addition concentration is used -- saccharification -- what is necessary is just to be by concentration which can fully detect amino acid, 0.01 – 1000U/ml is preferred, and 0.1 – 500U/ml is more preferred.

[0036] saccharification which can be used for this invention -- detection of enzyme actions which act on amino acid, For example, when dehydrogenase is used, for variation of a coenzyme, nicotinamide adenine dinucleotide (it abbreviates to NAD below.), for example as a coenzyme to a **** case. .

[whether reduction type NAD which is a reduction type coenzyme is directly quantified with a color comparator on wavelength near / which is the absorption maximum wavelength band / 340 nm, and] A produced reduction type coenzyme Or various diaphorases or a phenazine methosulfate (it abbreviates to PMS below.), An electron carrier and nitro tetrazolium, such as methoxy PMS and dimethylaminobenzophenoxadinium chloride (meld rubble), (4-India phenyl) 2- -3--5-(4-nitrophenyl) (2 and 4 disulfo phenyl)-2H-tetrazolium, Monosodium salt (WST-1) – 2-(2- methoxy-4- nitrophenyl)-3-(4- nitrophenyl)-5-(2-methoxy-4- nitrophenyl)-3-(4- nitrophenyl)-5-(2,4- disulfo phenyl)-2H-tetrazolium, 1 sodium salt (WST-8) (water-soluble tetrazolium salt series 1-8) (above) It may quantify indirectly using reduction system color reagents, such as various tetrazolium salt represented by member Institute for Chemical Research make, and may measure directly and indirectly by publicly known methods other than this.

[0037] For example, when oxidase is used, it is preferred to measure an amount of consumption of oxygen or quantity of a resultant. As a resultant, when fructosamine oxidase is used, for example, hydrogen peroxide and glucosone can generate by a reaction, and hydrogen peroxide and glucosone can be measured directly and indirectly by a publicly known method. Quantity of the above-mentioned hydrogen peroxide may generate coloring matter etc., for example using POD etc., may quantify them according to coloring, luminescence, fluorescence, etc., using catalase etc., makes aldehyde generate from alcohol and may quantify quantity of produced aldehyde.

[0038] A coloring system of hydrogen peroxide is 4-AA or the 3-methyl- 2 under existence of POD. – The Trinder reagent which generates coloring matter according to oxidation condensation with couplers, such as benzo thiazolinone hydrazone (it omits the following MBTH.), and chromogens, such as phenol, A leuco mold reagent etc. which carry out direct oxidation coloration under existence of POD can be used. As a chromogen of the Trinder type reagent, a phenol derivative, an aniline derivative, It is usable and a toluidine derivative etc. as an example N, N dimethylaniline, N,N-diethylaniline, 2,4-dichlorophenol, N-ethyl-N--(2-hydroxy-3-sulfopropyl) 3, and 5-dimethoxyaniline (DAOS), N-ethyl-N- The sulfopropyl 3, 5 dimethylaniline (MAPS), N-ethyl- N --3,5-(2-hydroxy-3- sulfopropyl) Dimethylaniline (MAOS), N-ethyl- N -(2-hydroxy-3- sulfopropyl)- M-toluidine (TOOS), N-ethyl-N- sulfopropyl m- Anisidine (ADPS), N-ethyl-N- Sulfopropylaniline (ALPS), N-ethyl- N - Sulfopropyl 3,5 – Dimethoxyaniline (DAPS), N-sulfopropyl 3,5- [– Anisidine (ADOS),] Dimethoxyaniline (HDAPS), N-ethyl- N - Sulfopropyl m - A toluidine (TOPS) and N-ethyl-N-(2- hydroxy-3- sulfopropyl)-m N-ethyl-N-(2-hydroxy-3- sulfopropyl) aniline (ALOS), N -(2-hydroxy-3- sulfopropyl)-3,5-Dimethoxyaniline (HDAOS), N-sulfopropylaniline (HALPS) (above, member Institute for Chemical Research make), etc. are mentioned.

[0039] As an example of a leuco mold reagent, o-dianisidine, o-tolidine, 3,3 Diaminobenzidine, 3,3,5,5-tetramethyl benzidine (above) Member Institute for Chemical Research make and N -(carboxymethyl)

aminocarbonyl)-4,4-Bis(dimethylamino)biphenyl amine (DA64), 10 -(carboxymethyl aminocarbonyl)-3,7-bis(dimethylamino)phenothiazin (DA67) (above, Wako Pure Chem make) etc. -- it is mentioned. [0040]A compound which furthermore shows a fluorescence by oxidation to a fluorescence method, for example, homovanillic acid, 4-hydroxyphenyl acetic acid, tyramine, the Parakou resol, a diacetyl full ORESUSHIN derivative, etc. can be used for a chemiluminescence method for luminol, lucigenin, isoluminol, pyrogallol, etc. as a catalyst. Using catalase etc., aldehyde is made to generate from alcohol and a method of using a Hantzsch reaction, a method of making it color by a condensation reaction with MBTH or a method of using aldehyde dehydrogenase, etc. is mentioned as a method of quantifying produced aldehyde. What is necessary is just to quantify a fixed quantity of glucosone using publicly known aldose reagents, such as diphenylamine.

[0041]a protein quantification reagent, a proteolysis reagent, and saccharification -- as a procedure which combines an amino acid color reagent, for example, a protein quantification reagent and saccharification -- choosing a kind of color reagent so that detection wave length of a reagent for amino acid fixed quantity may become equal -- then, a signal of protein quantification -- saccharification -- so that a signal of an amino acid fixed quantity may not be affected, concentration of protease, proteolysis, and saccharification -- what is necessary is just to determine pH of amino acid coloring a signal of protein quantification -- saccharification, in order to adjust conditions so that a signal of an amino acid fixed quantity may not be affected, adding protease of quantity enough -- saccharification -- what is necessary is to terminate a proteolysis reaction, before adding an amino acid assaying reagent, and just to adjust so that signal change of a protein quantification reagent accompanying a proteolysis reaction may become fixed For example, since there is coloring matter violently colored by alkalinity, albumin assaying reagents, such as BCP, BCG, BPB, and MO, need to take care that a protein quantification reagent does not affect a glycated protein fixed quantity, and need to choose pH of a reaction.

[0042]a protein quantification reagent and saccharification -- for setting up so that detection wave length of an amino acid assaying reagent may become equal -- protein quantification coloring matter and saccharification -- an absorption maximum wavelength of amino acid fixed-quantity coloring matter is good in their being an identical wavelength or its neighborhood. In the neighborhood's being just a range which can do protein and glycated protein in a biogenic substance in fixed quantity by sufficient sensitivity in a measured wavelength, for example, using coloring matter detectable in UV - a visible region, a healthy person's sample (amount of albumin 3.5-5.5-/dl, 12-18 g/dl of hemoglobin, 11.6 to 16.3% of glycated albumin, and glycosylated hemoglobin 4.3%-5.8 %) from -- an absorbance obtained should just be 50 or more mAbs in each reagent. for example, albumin -- saccharification -- HABA as an albumin assaying reagent, when it quantifies a rate, Protease type XXVII (made by a sigma company) which shows high decomposition activity to albumin as a proteinic decomposition reagent, saccharification -- R-FOD (made by Asahi Chemical Industry Co., Ltd.) being chosen as the main ingredients of a reagent for amino acid fixed quantity, and, Since a fixed quantity of albumin is possible for HABA near 480-550 nm, in order to carry out the colorimetry of the hydrogen peroxide produced by R-FOD, for example, coloring matter which has sensitivity sufficient near 480-550 nm -- for example, -- -- what is necessary is just to choose combination of coloring matter (4-AA, TOOS, etc.; lambdamax=555nm) which has absorption maximum in 400-630 nm Since it is usable with pH4.0 - 9.0 and coloring etc. are not seen by a pH change in the meantime when using HABA, a decomposition reagent of continuing protein may be chosen as which pH -- saccharification -- a reagent for amino acid fixed quantity has a strong operation of R-FOD -- it can set up in pH 5.0 to 10.0. as [] protease concentration -- 500 to 500,000 PU/ml is preferred, and 1000 to 100,000 PU/ml is more preferred.

[0043]In using BCP instead of HABA, absorption maximum of coloring of BCP-albumin is near 600 nm -- from a fixed quantity of albumin being possible by 550 - 630 nm. for example, coloring matter which has sensitivity sufficient near 550 - 630 nm -- for example, -- -- what is necessary is just to choose combination (lambdamax = 582 nm), such as coloring matter which has absorption maximum in 480-700 nm, MBTH, and HALP In order to color BCP violently above neutrality, it is used by pH4.5 - 7.5, a decomposition reagent of continuing protein, and saccharification -- the amino acid assaying reagent needs to choose the pH 7.5 following -- for example, saccharification -- an amino acid assaying reagent can be set up in [] pH 5.0 to 7.5, if optimal pH of R-FOD is taken into

consideration. In using BCG instead of HABA, Since absorption maximum of BCG-albumin is near 630 nm and a fixed quantity of albumin is possible at 530 – 670 nm, For example, what is necessary is just to choose combination ($\lambda_{\text{max}} = 630 \text{ nm}$), such as coloring matter which has sensitivity sufficient near 530–670 nm, for example, coloring matter which has absorption maximum in 450 – 750 nm, for example, 4-AA, and MAOS. a decomposition reagent of protein which continues in order to color BCG violently by the pH 5.6 above and saccharification -- the amino acid assaying reagent needs to choose the pH 5.5 following -- for example, saccharification -- an amino acid assaying reagent can be set up in [] pH 5.0 to 5.5, if optimal pH of R-FOD is taken into consideration.

[0044]hemoglobin -- saccharification, in quantifying a rate, Protease type XIV (made by a sigma company) which shows high decomposition activity to hemoglobin for an oxyhemoglobin method as a proteinic decomposition reagent as the hemoglobin quantitation method, saccharification -- R-FOD (made by Asahi Chemical Industry Co., Ltd.) being chosen as the main ingredients of a reagent for amino acid fixed quantity, and, Since MOGUROBIN has absorption maximum near 540 nm to oxy, in order to carry out the colorimetry of the hydrogen peroxide produced by R-FOD, For example, what is necessary is just to use combination ($\lambda_{\text{max}}=555$), such as coloring matter which has sensitivity sufficient near 540 nm, for example, coloring matter which has absorption maximum in 570 – 610 nm, 4AA, and TOOS. From METO-ization taking place in alkalinity and absorption changing, oxyhemoglobin. Measurement in acidity – neutral vicinity is preferred under existence of a surface-active agent, for example, it is TritonX-100. Under 0.01 to 10% of existence, a protease reaction which should just perform a fixed quantity of hemoglobin near pH5.0 –9.5, and continues, and saccharification -- it is good to also perform a detection reaction of amino acid near 5.0–9.5. moreover -- as [] protease concentration -- 500 to 100,000 PU/ml is preferred, and 1000 to 50,000 PU/ml is more preferred. a protein quantification reagent, a proteolysis reagent, and saccharification -- what is necessary is just to measure it with a commercial pH meter after dissolving in distilled water etc. after the dissolution, if it is a freeze-drying article if pH of an amino acid assaying reagent is liquefied and it is a liquefied frozen stock as it is

[0045]From the above thing, as a constituent for glycated protein rate fixed quantity in this invention, a reagent for protein quantification, protease, and saccharification -- what is necessary being just to prepare as a thing containing an enzyme which acts on amino acid, and, As a constituent for glycated protein rate fixed quantity which is not influenced by a globulin ingredient, a protein quantification reagent, protease, and a globulin ingredient -- an alternative protease inhibitor and saccharification -- what is necessary is just to prepare as a thing containing an enzyme which acts on amino acid, and it can provide as a freezing thing of a liquefied article and a liquefied article, or a freeze-drying article.

[0046]Furthermore, a surface-active agent, salts, a buffer, pH modifier, an antiseptic, etc. may be suitably chosen as a glycated protein rate assaying reagent presentation based on this invention, for example, and it may add to it. In a proper additive, it is polyoxyethylene alkyl ether as a surface-active agent. [For example, the triton X-100 and polyoxyethylene (23) lauryl ether (above, Nacalai Tesque, Inc. make)] Polyoxyethylene sorbitan fatty acid ester (Tween 20, Tween 40, Tween 60, Tween 80, and more than Tween 85;) The Kanto Kagaku make and polyoxyethylene glycerine fatty acid ester. Polyoxyethylene sorbitol fatty acid ester, a polyoxyethylene alkylphenyl formaldehyde condensate, Polyoxyethylene castor oil, polyoxyethylene sterol, and polyoxyethylene polyoxypropylene alkyl ether. Polyoxyethylene lanolin, polyoxyethylene alkylamine and fatty acid amide, Polyoxyethylene-alkyl-ether phosphoric acid and phosphates, and polyoxyethylene-alkyl-ether sulfate. Polyglyceryl fatty acid ester, glycerine fatty acid esters, and propylene glycol fatty acid ester. Sorbitan fatty acid ester species, N-acylamino-acid salts, and alkyl ether carboxylate. An alkyl-phosphoric-acid salt, N acyl taurine acid salt, a sulfonate, alkyl sulfuric acid, an acetic acid betaine type amphoteric surfactant, an imidazoline type amphotolytic surface active agent, a lecithin derivative (above, made in Nikko Chemicals), the ADEKA toll 720N, the ADEKA toll B-795, ADEKA toll SO-120 and ADEKA Norian B-795 (above, Asahi Denka Kogyo K.K. make), Polyethylene glycols, polyethylene-glycol lauryl ether, Polyethylene-glycol isoctylphenyl ether, a polypropylene glycol, Polyvinyl alcohol, the triton X-305, and the triton X-114, 0.01 to 10% of triton X-405 and triton WR-1339 (above, Nacalai Tesque, Inc. make) etc. Suitably 0.05 to 5%, various metal salt, for example, a lithium chloride, sodium chloride, 1mM, such as potassium chloride, a manganese chloride, a cobalt chloride, zinc

chloride, and a calcium chloride, - 5M, Suitably 10mM-1M and various buffer solution, for example, tris-chloride buffer solution, 10mM-2M, such as glycine NaOH buffer solution, a phosphate buffer, and Good's buffer, -- suitable -- 20mM-1M and various antiseptics, for example, sodium azide, -- what is necessary is just to add 0.05 to 1% suitably 0.01 to 10%

[0047] Thus, by constituent for glycated protein rate fixed quantity of prepared this invention (reagent), in order to quantify a glycated protein rate in sample liquid, Add 0.001-1.0 ml of sample liquid to a reagent for protein quantification, and it is made to react at 37 **, measuring an absorbance after fixed time which changed -- subsequently -- proteolysis reagent [] -- adding 0.001-1.0 ml and performing a proteolysis reaction at 37 ** -- subsequently -- saccharification -- amino acid assaying reagent [] -- what is necessary is to add 0.001-1.0 ml and just to measure an absorbance variation at 37 ** As compared with a proteolysis reaction, a protein quantification reaction from a very early thing. Add a protein quantification reagent and a proteolysis reagent simultaneously, and a proteinic fixed quantity is performed quickly, a proteolysis reaction may be advanced simultaneously -- a proteolysis reagent and saccharification -- adding an amino acid assaying reagent simultaneously -- a proteolysis reaction and saccharification -- an amino acid fixed-quantity reaction may be performed simultaneously. In this case, if it compares with an absorbance variation at the time of measuring standard protein of protein concentration which is the target of known concentration, and glycated protein concentration, It can ask for protein concentration and the target glycated protein concentration which are the targets in sample liquid, and a glycated protein rate can be computed by taking this rate.

[0048]

[Embodiment of the Invention] Subsequently, although working example of this invention is described in detail, thereby, this invention is not limited at all.

[Work example 1]

アルブミン定量色素に及ぼすpHの影響

<試薬組成>

アルブミン定量色素	HABA	0.0167%
	BCG	0.00167%
	BCP	0.00167%
緩衝液 pH4、5、6 クエン酸緩衝液	67mM	
pH7、8、9 トリス緩衝液	67mM	
界面活性剤	Brij i35	1 %

[0049]<Substrate solution> HSA substrate solution; Albumin Human ; Essentially Globulin Free ; 25 mg/ml, the rate of glycated albumin = 31.9% and fructosamine value =265 mumol/L [sigma company make; The concentration of the albumin in a substrate solution is quantified by an albumin measurement kit (albumin II-HA Test Wako; made by Wako Pure Chem), Measuring the rate of glycated albumin with a glycated albumin measurement plan (GAA-2000; made by the first science company of Kyoto), a fructosamine value is a fructosamine measurement kit (it measured in auto WAKO fructosamine (made by Wako Pure Chem).)]

[0050] 1.2 ml of <operation> reaction mixture is taken in a test tube, and a 0.06-ml HSA substrate solution or distilled water is added. It allows to stand 1 minute or more at an after-stirring room temperature, and an absorption spectrum is measured with a spectrophotometer. The result was indicated to drawing 1 - 3. Figure As shown in 1-3, HABA is pH4.0-9.0 (drawing 1), and BCG is pH 5.5 (drawing 2) or less, and it is usable with pH 4.5-7.5 (drawing 3) in BCP. From a low thing, the blank absorbance which added distilled water instead of the sample in this range. What is necessary is just to also adjust pH of the glycated protein assaying reagent directly added by the protein quantification reagent so that it may be set to pH4.5 - 7.5, when HABA is used after mixing, BCG is used for pH 4.0-9.0 and BCP is used for less than pH5.5. As a result of measuring 540-nm coloring of bottom hemoglobin of existence of a surface-active agent by various pH still more nearly similarly, in pH 5.0-9.5, it was usable.

[0051]

[Work example 2]

Influence <reagent presentation> 100mM tris-buffers pH 8.5.0.017% HABA166 mg/dl HSA (HSA of working example 1 description) of protease concentration exerted on albumin fixed-quantity coloring [0052]The <operation> above-mentioned reaction mixture 1.0 ml is poured distributively in an absorptiometer cell and it warms at 37 **. Light measurement of 545nm was started in the place where temperature became fixed, and 0.1 ml of protease solutions (protease type XXVII; made by a sigma company) in which concentration differs 1 minute after after a light measurement start were added, it continued, and the absorbance of 545 nm was measured. A result is shown in drawing 4. [0053]It is by the 500 PU/ml [more than] protease last concentration so that drawing 4 may show. 600 seconds (10 minutes) Change by the protease action of albumin coloring less than is completed. It was clear that what is necessary was just to perform glycated protein measurement which continues in 10 minutes at the latest by the 500 PU/ml [more than] protease last concentration. [0054]

[Work example 3]

albumin -- saccharification -- measurement 1 <R-1> 10mM Tris buffer solution pH8.5 of a rate 8mM 4-AA (made by Wako Pure Chem)
15U/ml POD (made by a sigma company)
10mg [/ml] protease type XXVII (sigma company make.) 1 It is 1% (3-[*(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio*]-2-hydroxy-1-propanesulfonate; it omits the following CHAPSO.) 10,000 PU/ml.
0.6mM AlCl₃0.017% HABA[0055]

<R-2 > 150mM Tris緩衝液 pH8.5

12mM TOS

24U/ml POD

[0056]The HSA substrate solution (2.5 g/dl) of <substrate solution> working example 1 description is prepared, and it is 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, and 1.0. The sample of double concentration was created.

[0057]<Operation> above-mentioned R-1 270 (protein quantification reagent, proteolysis reagent) microl was taken in the cell, it incubated at 37 **, sample 9microl was added and stirred, and the reaction was started at 37 **. The absorbance (A1) of 545 nm was measured in order to calculate a protein quantification value 10 seconds after after a reaction start, and the proteolysis reaction was succeedingly continued at 37 **. after [] a reaction start -- measuring the absorbance (A2) of 545 nm behind for 270 seconds (4.5 minutes) -- 300 seconds after a reaction start (5 minutes) -- after -- the above R-2 -- 90microl -- adding and stirring -- 37 more ** -- 300 seconds [(5 minutes)] -- the between reaction was performed and the absorbance (A3) of 545 nm was measured. The blank sample was measured similarly and A1 blank, A2 blank, and A3 blank were measured. Absorbance variation of an albumin fixed quantity (deltaA (Alb)) (A3-A2) It calculated by absorbance variation (deltaA (GA)) - (A3 blank A2 blank) of A1-A1 blank and a glycated protein fixed quantity. HSA concentration 1.0 Twice and 0.6 Twice and a blank reaction curve are shown in drawing 5, and a measurement result is shown in drawing 6.

[0058]Coloring is checked by the reaction of an albumin assaying reagent immediately after a reaction start so that drawing 5 may show, Albumin is disassembled by the reaction of protease after that and it is 200. From having settled in the level before sample addition mostly in the second neighborhood. what is necessary is just to perform an albumin fixed quantity immediately after a reaction start -- 200 -- the saccharification which continues after a second -- it was clear by performing an amino acid fixed quantity not to be influenced by the absorbance variation originating in an albumin fixed quantity. The sample which diluted the HSA reference standard is an albumin fixed quantity so that drawing 6 may show. (***) Glycated albumin acidimetry (O) Good linearity was both shown, and even if continuously measured in the reaction-of-identity tub, it became clear that a fixed quantity can be performed satisfactorily. The still more nearly same reagent is used and it is Homo sapiens globulin (sigma company make; it corn-fraction-II(s) and. III) As a result of melting so that it may become human-serum concentration (1.69mg/(ml)), and performing same measurement, an albumin fixed quantity and glycated albumin acidimetry were below the detection limit, and it was clear to have measured only glycated albumin selectively.

[0059]

[Work example 4]

albumin -- saccharification -- measurement 2 <R-1> 10mM Tris buffer solution pH7.25 of a rate 8mM 4-AA (made by Wako Pure Chem)

15U/ml POD (made by a sigma company)

10mg [/ml] alkaline protease (the Nagase & Co., Ltd. make, 3000 PU/ml) -- 1% CHAPSO 0.4mM AlCl₃ 10mM EDTA 0.001675% BCP 0.5% Tween20[0060]

<R-2 > 150mM Tris緩衝液 pH8.5

12mM TOOS

24U/ml POD

[0061]The HSA substrate solution (2.5 g/dl) of <substrate solution> working example 1 description is adjusted, and it is 0.0, 0.25, 0.5, 0.75, and 1.0. The sample of double concentration was created.

[0062]<Operation> above-mentioned R-1 270 (protein quantification reagent, proteolysis reagent) microl was taken in the cell, it incubated at 37 **, sample 9microl was added and stirred, and the reaction was started at 37 **. The absorbance (A1) of 600 nm was measured in order to calculate a protein quantification value 10 seconds after after a reaction start, and the proteolysis reaction was successingly continued at 37 **. a part for 4.5 after a reaction start -- after -- measuring the absorbance (A2) of 600 nm -- a part for five after a reaction start -- after -- the above R-2 -- 90microl -- it added and stirred, the reaction was performed for 37 more ** 5 minutes, and the absorbance (A3) of 600 nm was measured. The blank sample was measured similarly and A1 blank, A2 blank, and A3 blank were measured. The absorbance variation of an albumin fixed quantity was calculated by A1-A1 blank and absorbance variation (A3-A2) - (A3 blank A2 blank) of a glycated protein fixed quantity. A measurement result is shown in drawing 7.

[0063]Even if the sample which diluted the HSA reference standard showed linearity with good albumin fixed-quantity (**) and glycated albumin acidimetry (O) even if it used BCP like HABA and it measured in the reaction-of-identity tub so that drawing 7 might show, it became clear that a fixed quantity can be performed satisfactorily.

[0064]

[Work example 5]

hemoglobin -- saccharification -- measurement <R-1> 10mM Tris buffer solution pH8.5 of a rate 8mM 4-AA (made by Wako Pure Chem)

15U/ml POD (made by a sigma company)

200mg [/ml] protease type XIV (sigma company make, 13mU(Hb) / ml) 1% TritonX-100 0.6mM AlCl₃

[0065]

<R-2 > 150mM Tris緩衝液 pH8.5

12mM TOOS

24U/ml POD

[0066]<Substrate solution> Hb substrate solution; Hemoglobin Human;5.5 g/dl, rate;HbAof glycosylated hemoglobin1c =4.5% [sigma company make; the HbA1c value was measured with the glycosylated hemoglobin plan (high auto A1 See HA-8150; made by the first science company of Kyoto).]

Hb substrate solution (5.5 g/dl) is adjusted and it is 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, and 1.0. The sample of double concentration was created.

[0067]<Operation> above-mentioned R-1 540 (protein quantification reagent, proteolysis reagent) microl was taken in the cell, it incubated at 37 **, 18micro of samples I were added and stirred, and the reaction was started at 37 **. The absorbance (A1) of 545 nm was measured in order to calculate a hemoglobin quantitation value 50 minutes after after a reaction start, and reaction mixture was filtered 60 minutes after after a reaction start by the film (ultra free MC; made by Millipore Corp.) of the exclusion molecular weight 10,000. saccharification -- a fixed quantity of amino acid -- the above R-2 after measuring the absorbance (A2) of filtrate 279mul -- 90microl -- it added and stirred, the reaction was performed for 37 more ** 5 minutes, and the absorbance (A3) of 545 nm was

measured. The blank sample was measured similarly and A1 blank, A2 blank, and A3 blank were measured. The absorbance variation of hemoglobin quantitation calculated A1-A1 blank and the absorbance variation of a glycated protein fixed quantity by (A3-A2) - (A3 blank A2 blank). A measurement result is shown in drawing 8 (the hemoglobin quantitation value multiplied by it and displayed 1/10 on the absorbance variation.). Even if linearity with good hemoglobin quantitation (**) glycated hemoglobin fixed-quantity (O) was shown and it measured in the reaction-of-identity tub like albumin so that drawing 8 might show, it became clear that a fixed quantity can be performed satisfactorily.

[0068]The still more nearly same reagent is used and it is Homo sapiens globulin (sigma company make; it corn-fraction-II(s) and. III) As a result of melting so that it may become human-serum concentration (1.69mg/(ml)), and performing same measurement, hemoglobin quantitation and a glycated hemoglobin fixed quantity were below the detection limit, and it was clear that avoided the influence of the globulin ingredient in a blood serum, and hemoglobin was measured.

[0069]

[Work example 6]

糖化アルブミンHPLC法と酵素法（本発明）の相関性

<R-1> 実施例4と同じ。

<R-2> 実施例4と同じ。

<基質溶液> 糖尿病患者血清 10検体

健常者血清 10検体

<操作> 操作は実施例4と同じ。

[0070]Correlation of the enzymatic process based on this invention and the publicly known HPLC method was checked using the healthy person and diabetic blood serum 20 sample. Measurement of the HPLC method measured the rate of glycated albumin with the glycated albumin plan (GAA-2000; made by the first science company of Kyoto). albumin -- saccharification -- rate HSA of the working example 1 description was used as the calibrator, and it computed from the glycated albumin fixed-quantity value / albumin fixed-quantity value. The glycated albumin rate acquired from the determination method based on result this invention indicated the correlation coefficient $r= 0.957$ and very good correlation to be rates of the HPLC method glycated albumin, and the determination method based on this invention became clear [quantifying glycated albumin correctly].

[Translation done.]

*** NOTICES ***

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.**** shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

DESCRIPTION OF DRAWINGS**[Brief Description of the Drawings]**

[Drawing 1]The pH dependency of HABA coloring based on working example 1 of this invention is shown.

[Drawing 2]PH dependency **** of BCG coloring based on working example 1 of this invention.

[Drawing 3]PH dependency **** of BCP coloring based on working example 1 of this invention.

[Drawing 4]Influence **** of protease concentration exerted on the albumin coloring change based on working example 2 of this invention. .

[Drawing 5]Time course **** of the glycated albumin measurement reaction based on working example 2 of this invention.

[Drawing 6]Time course **** of the glycated albumin measurement reaction based on working example 3 of this invention.

[Drawing 7]Fixed-quantity curvilinear **** of albumin and glycated albumin based on working example 4 of this invention.

[Drawing 8]The fixed-quantity curve of hemoglobin and glycosylated hemoglobin based on working example 5 of this invention is shown.

[Translation done.]

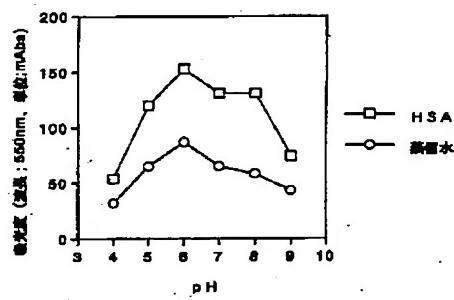
* NOTICES *

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

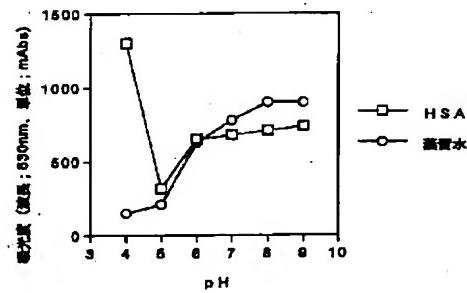
1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

DRAWINGS

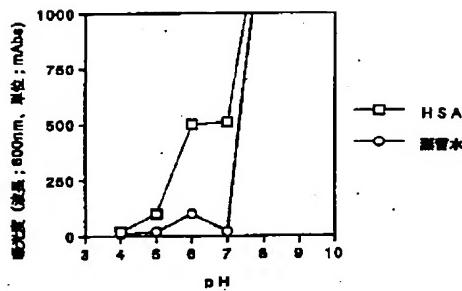
[Drawing 1]



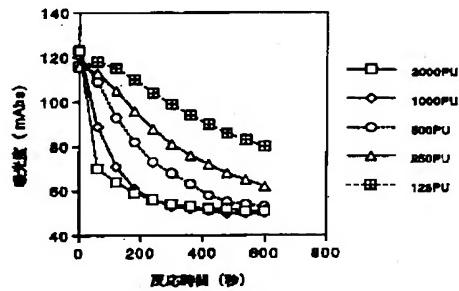
[Drawing 2]



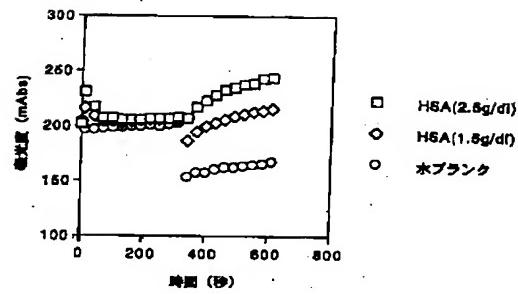
[Drawing 3]



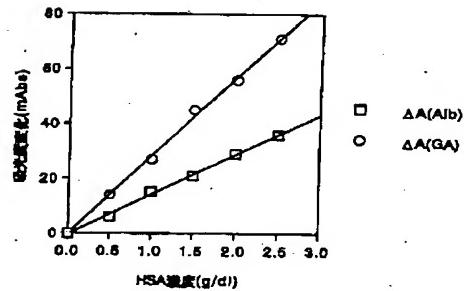
[Drawing 4]



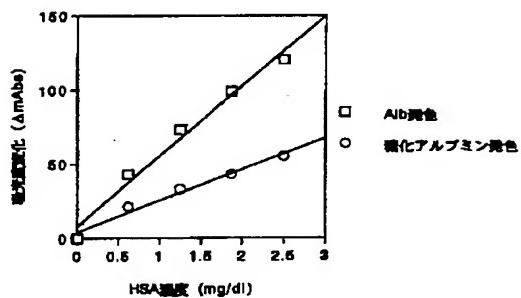
[Drawing 5]



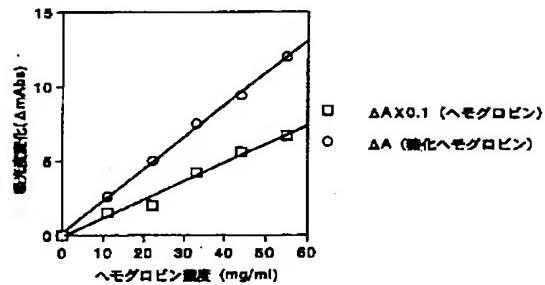
[Drawing 6]



[Drawing 7]



[Drawing 8]



[Translation done.]

* NOTICES *

JPO and INPIT are not responsible for any
damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.**** shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

CORRECTION OR AMENDMENT

[Kind of official gazette]Printing of amendment by regulation of Patent Law Article 17 of 2

[Section Type] The 1st Type of the part I gate

[Publication date]Heisei 14(2002) August 27 (2002.8.27)

[Publication No.]JP,2001-204495,A (P2001-204495A)

[Date of Publication]Heisei 13(2001) July 31 (2001.7.31)

[Annual volume number] Publication of patent applications 13-2045

[Application number]Application for patent 2000-20224 (P2000-20224)

[The 7th edition of International Patent Classification]

C12Q 1/37

1/26

G01N 33/68

33/72

[FI]

C12Q 1/37

1/26

G01N 33/68

33/72 A

[Written Amendment]

[Filing date]Heisei 14(2002) June 6 (2002.6.6)

[Amendment 1]

[Document to be Amended]Description

[Item(s) to be Amended]Claims

[Method of Amendment]Change

[Proposed Amendment]

[Claim(s)]

[Claim 1]A measuring method of a rate over protein of glycated protein performing the following process of 1-3 in a reaction-of-identity tub :

1) A fixed quantity of protein in sample liquid

2) Protease treatment of this protein

3) saccharification -- saccharification using an enzyme which acts on amino acid -- a fixed quantity of amino acid

[Claim 2]protease -- a globulin ingredient -- a method according to claim 1 of making it act under existence of alternative inhibitor.

[Claim 3]A method according to claim 1 or 2 of performing a proteinic fixed quantity and a fixed

quantity of glycated protein with an identical wavelength.

[Claim 4]A way according to any one of claims 1 to 3 protein is albumin or hemoglobin.

[Claim 5]A way according to any one of claims 1 to 4 concentration of protease is 500 PU(s)/more than ml.

[Claim 6]A way according to any one of claims 3 to 5 albumin fixed-quantity coloring matter is 2-(4' hydroxybenzeneazo) benzoic acid, and pH at the time of an albumin fixed quantity is pH4.0-9.0, and pH at the time of a glycated albumin fixed quantity is pH5.0-10.0.

[Claim 7]A way according to any one of claims 3 to 5 albumin fixed-quantity coloring matter is bromocresol green, and pH at the time of an albumin fixed quantity is less than pH5.5, and pH at the time of a glycated albumin fixed quantity is pH 5.0-5.5.

[Claim 8]A way according to any one of claims 3 to 5 albumin fixed-quantity coloring matter is bromocresol purple, and pH at the time of an albumin fixed quantity is 4.5-7.5, and pH at the time of a glycated albumin fixed quantity is 5.0-7.5.

[Claim 9]A way according to any one of claims 3 to 5 a surface-active agent which contains a sulfuric acid group at least, a nonionic surfactant, and/or both ionic surfactants are added at the time of a fixed quantity of hemoglobin, and hemoglobin and pH at the time of a glycosylated hemoglobin fixed quantity are 5.0-9.5.

[Claim 10]a protein quantification reagent, protease, and saccharification -- a constituent for rate measurement to protein of glycated protein containing an enzyme which acts on amino acid.

[Claim 11]a protein quantification reagent, protease, a globulin alternative protease inhibitor, and saccharification -- a constituent for rate measurement to protein of glycated protein containing an enzyme which acts on amino acid.

[Claim 12]coloring matter for protein quantification, and saccharification -- the constituent according to claim 10 or 11, wherein an absorption maximum wavelength of coloring matter for protein fixed quantity is in an identical wavelength or its neighborhood.

[Claim 13]The constituent according to claim 10 to 12 whose protein is albumin or hemoglobin.

[Claim 14]The constituent according to claim 13 whose albumin fixed-quantity coloring matter is 2-(4' hydroxybenzeneazo) benzoic acid and whose pH of an albumin assaying reagent is pH4.0-9.0.

[Claim 15]The constituent according to claim 14 whose absorption maximum of glycated albumin coloring matter is 400-630 nm.

[Claim 16]The constituent according to claim 13 whose albumin fixed-quantity coloring matter is bromocresol green and whose pH of an albumin assaying reagent is the pH 5.5 following.

[Claim 17]The constituent according to claim 16 whose absorption maximum of glycated albumin coloring matter is 450-750 nm.

[Claim 18]The constituent according to claim 13 whose albumin fixed-quantity coloring matter is bromocresol purple and whose pH of an albumin assaying reagent is pH4.5-7.5.

[Claim 19]The constituent according to claim 18 whose absorption maximum of glycated albumin coloring matter is 480-700 nm.

[Claim 20]The constituent according to claim 13 whose pH of a hemoglobin quantitation reagent a hemoglobin quantitation reagent contains a surface-active agent which contains a sulfuric acid group at least, a nonionic surfactant, and/or both ionic surfactants, and is pH5.0-9.5.

[Translation done.]

(19)日本特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2001-204495

(P2001-204495A)

(43)公開日 平成13年7月31日 (2001.7.31)

(51)Int.Cl.⁷

C 1 2 Q 1/37
1/26
G 0 1 N 33/68
33/72

識別記号

F I

C 1 2 Q 1/37
1/26
G 0 1 N 33/68
33/72

テマコト^{*}(参考)

2 G 0 4 5
4 B 0 6 3

A

審査請求 未請求 請求項の数17 O.L. (全 13 頁)

(21)出願番号

特願2000-20224(P2000-20224)

(22)出願日

平成12年1月28日 (2000.1.28)

(71)出願人 000000033

旭化成株式会社
大阪府大阪市北区堂島浜1丁目2番6号

(72)発明者 高妻 阜司

静岡県田方郡大仁町三福632番地の1 旭
化成工業株式会社内

(74)代理人 100090941

弁理士 藤野 清也 (外2名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 糖化タンパク質割合測定方法

(57)【要約】

【課題】 同一反応槽中で簡単にタンパク質に対する糖化タンパク質の割合を測定する方法を提供する。

【解決手段】 次の1)~3)の工程を同一反応槽中で行うことによりなる糖化タンパク質の割合の測定方法; 1)被検液中のタンパク質の定量、2)該タンパク質のプロテアーゼ処理、及び、3)糖化アミノ酸に作用する酵素を用いた糖化アミノ酸の定量。タンパク質定量試薬と糖化タンパク質定量試薬を用いる場合の反応pH及び発色色素の組み合わせを最適化し、さらにプロテアーゼを500PU/ml以上作用させることによりタンパク質定量試薬の発色変化が糖化タンパク質定量に影響を及ぼさないように調節する。血清、血漿若しくは全血中のタンパク質に対する糖化タンパク質の割合を、正確、簡便、安価に定量できる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 次の1)～3)の工程を同一反応槽中で行うこととする糖化タンパク質のタンパク質に対する割合の測定方法：

1) 被検液中のタンパク質の定量

2) 該タンパク質のプロテアーゼ処理

3) 糖化アミノ酸に作用する酵素を用いた糖化アミノ酸の定量

【請求項2】 プロテアーゼをグロブリン成分選択性的阻害剤の存在下に作用せしめる請求項1に記載の方法。

【請求項3】 タンパク質の定量及び糖化タンパク質の定量を同一波長で行う請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】 タンパク質がアルブミン若しくはヘモグロビンである請求項1～3のいずれかに記載の方法。

【請求項5】 プロテアーゼの濃度が500PU/ml以上である請求項1～4のいずれかに記載の方法。

【請求項6】 アルブミン定量色素が2-(4'ヒドロキシベンゼンアゾ)安息香酸であり、アルブミン定量時のpHがpH4.0～9.0であり、かつ糖化アルブミン定量時のpHがpH5.0～10.0である請求項3～5のいずれかに記載の方法。

【請求項7】 アルブミン定量色素がプロモクレゾールグリーンであり、アルブミン定量時のpHがpH5.5以下であり、かつ糖化アルブミン定量時のpHがpH5.0～5.5である請求項3～5のいずれかに記載の方法。

【請求項8】 アルブミン定量色素がプロモクレゾールパープルであり、アルブミン定量時のpHが4.5～7.5であり、かつ糖化アルブミン定量時のpHが5.0～7.5である請求項3～5のいずれかに記載の方法。

【請求項9】 ヘモグロビンの定量時に、少なくとも硫酸基を含有する界面活性剤、及び／又は非イオン性界面活性剤、及び／又は両イオン性界面活性剤を添加し、かつヘモグロビン及び糖化ヘモグロビン定量時のpHが5.0～9.5である請求項3～5のいずれかに記載の方法。

【請求項10】 タンパク質定量試薬、プロテアーゼ及び糖化アミノ酸に作用する酵素を含有してなる糖化タンパク質のタンパク質に対する割合測定用組成物。

【請求項11】 タンパク質定量試薬、プロテアーゼ、グロブリン選択性的プロテアーゼ阻害剤及び糖化アミノ酸に作用する酵素を含有してなる糖化タンパク質のタンパク質に対する割合測定用組成物。

【請求項12】 タンパク質定量用色素及び糖化タンパク質定量用色素の吸収極大波長が、同一波長若しくはその近傍にあることを特徴とする請求項10または11記載の組成物。

【請求項13】 タンパク質がアルブミンまたはヘモグロビンである請求項10～12記載の組成物。

【請求項14】 アルブミン定量色素が2-(4'ヒドロキシベンゼンアゾ)安息香酸であり、アルブミン定量試薬のpHがpH4.0～9.0である請求項13記載の組成物。

【請求項15】 アルブミン定量色素がプロモクレゾールグリーンであり、アルブミン定量試薬のpHがpH5.5以下である請求項13記載の組成物。

【請求項16】 アルブミン定量色素がプロモクレゾールパープルであり、アルブミン定量試薬のpHがpH4.5～7.5である請求項13に記載の組成物。

【請求項17】 ヘモグロビン定量試薬が、少なくとも硫酸基を含有する界面活性剤、及び／又は非イオン性界面活性剤、及び／又は両イオン性界面活性剤を含有し、かつヘモグロビン定量試薬のpHがpH5.0～9.5である請求項13記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は糖化タンパク質のタンパク質に対する割合の定量方法及び定量用組成物に関する。更に詳しくは、酵素を用いた、簡便、迅速、かつ臨床生化学検査分野に有用な糖化タンパク質のタンパク質に対する割合定量法及び定量用組成物に関する。

【0002】

【従来の技術】糖尿病の診断及び管理を行う上で糖化タンパク質の測定は非常に重要であり、過去約1～2ヶ月の平均血糖値を反映する糖化ヘモグロビン、過去約2週間の平均血糖値を反映する糖化アルブミン及び、血清中の還元能を示す糖化タンパク質の総称であるフルクトサミン等が日常的に測定されている。中でも糖化アルブミン及び糖化ヘモグロビンは、タンパク質あたりの糖化タンパク質割合で値が示されている為に、個人差が少なく、またタンパク質濃度の影響を受けないことから、糖尿病のスクリーニング及び病態管理の目的で日常的に測定が行われている。

【0003】糖化タンパク質の定量法としては、以下の(a)～(e)の方法及び酵素法が知られている。

(a) クロマトグラフィ法〔J.Clin.Chem.Clin.Biochem.19:81～87(1981)〕。

(b) 電気泳動法〔Clin.chem.26:1958～1602(1980)〕。

(c) 免疫法〔JCLLA 18:620(1993)〕。

(d) アルカリ性に於ける糖化タンパク質の還元性を利用したフルクトサミンの測定方法〔Clin.Chem.Acta 127:87～95(1982)〕。

(e) チオバルビツール酸を用いる方法〔Clin.Chem.Acta 112:197～204(1981)〕。

前記(a)、(b)の方法は、操作性、精度、高価な専用装置を必要とするなどの問題が多く、前記(c)の方法は精度が必ずしも良くなく、また前記(d)、(e)の方法は検体中の共存物質の影響を受け特異性の点で問題があつた。

【0004】精度が高く、簡便かつ安価な定量方法としては酵素法があげられ、下記(f)～(i)の方法が知られている。

(f) プロナーゼ処理～フルクトシルアミンデグリカーゼ

にてフルクト-ナミンを測定する方法（特開平6-46846号公報）。

(g) プロテアーゼ処理を行いフルクトシルアミノ酸オキシダーゼにて検出する方法（特開平5-192193号公報）。

(h) リジン残基遊離試薬- ϵ -アルキルリジナーゼにて検出する方法（特開平2-195900号公報）。

(i) リジン残基遊離試薬-CH-OH基を水素供与体としNADおよび／またはNADPを水素供与体とする酸化還元酵素にて検出する方法（特開平2-195899号公報）。

【0005】また本発明者らのグループは糖化アミノ酸に作用する酵素を生産する実質上純粋な形質転換された微生物を作成し、熱安定性及び反応性が高い、フルクトシルアミノオキシダーゼを効率よく生産する方法（特開平10-201473号公報）を開発してきた。しかし、酵素法は簡便、安価かつ正確である反面、別途該タンパク質の総量を定量し、酵素法で得られた定量値を除することにより糖化タンパク質割合を算出する必要があり、これまでタンパク質の定量及び糖化タンパク質の定量を同一反応槽中で行った例はなかった。さらに、血液中には様々な疾病によりその量が大きく変化することが知られているグロブリン成分が大量に存在するために、本発明者らは、グロブリン成分の影響を回避し、グロブリン成分以外のタンパク質中の糖化タンパク質を選択的に測定する方法（特願平11-231259号）を開発してきた。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、臨床生化学検査における有用なタンパク質に対する糖化タンパク質の割合定量方法、及びその定量に使用するための定量用組成物を提供することにある。さらに詳しくは、本発明の目的は、タンパク質の定量及び酵素法を用いた該タンパク質の糖化物の定量を同一反応槽で行うことにより、タンパク質に対する糖化タンパク質の割合を簡便に定量する方法、及びその定量に用いる定量用組成物を提供することにある。

【0007】

【課題を解決するための手段】上記の目的を達成する為了には、タンパク質の定量、該タンパク質のプロテアーゼ処理、糖化アミノ酸の定量を同一反応槽中で行えば良い。しかし、タンパク質を定量する条件と糖化タンパク質を定量する条件（例えば測定のpH、波長等）が異なる点、タンパク質の定量液にプロテアーゼを作用させると、そのタンパク定量色素等の発色が変化し、続く糖化タンパク質の測定に大きな影響を生じる点、タンパク質定量試薬によっては糖化タンパク定量条件により激しく着色する点、糖化アルブミン若しくは糖化ヘモグロビンの割合を定量するには、血液中のアルブミン若しくはヘモグロビンの中の糖化物のみを選択的に測定する必要がある点から単純に公知の技術の組み合わせのみでは、両者を同一反応槽中で正確に測定することは困難であった。

【0008】そこで本発明者らは、鋭意検討の結果、タンパク質定量に用いる色素と糖化タンパク質定量に用いる色素の組み合わせを最適化する事により1波長連続測定が可能であること、及びプロテアーゼを作用させる条件を調節することによりプロテアーゼ作用によるタンパク質濃度測定の発色変化を回避し得ること、及びタンパク質定量用色素の種類と糖化タンパク質検出のpHを最適化することでタンパク質発色試薬の異常着色を回避することができることを見出した。またさらに、本発明者らが開発してきたグロブリン成分の影響を回避する方法（特願平11-231259号）と組み合わせることにより、血液中のアルブミン及びヘモグロビンの糖化割合をグロブリン成分の影響を小さくして測定できることを見出し本発明の完成に至った。

【0009】すなわち、本発明はこのような目的を達成する為に行われたものであって、臨床生化学検査におけるタンパク質に対する糖化タンパク質の割合測定に有用な定量方法及び定量用組成物として用いられる。本発明は、次の1)～3)の工程を同一反応槽中で行うことを特徴とする糖化タンパク質割合測定方法に関する：

- 1) 被検液中のタンパク質の定量、
- 2) 該タンパク質のプロテアーゼ処理
- 3) 糖化アミノ酸に作用する酵素を用いた糖化アミノ酸の定量

本発明では、糖化タンパク質定量値をタンパク質定量値で除し、タンパク質に対する糖化タンパク質の割合を算出するとよい。また、本発明は、タンパク質定量試薬、プロテアーゼ及び糖化アミノ酸に作用する酵素を含有してなる糖化タンパク質の割合定量用組成物に関する。

【0010】本発明の構成及び好ましい形態について更に詳しく説明する。本発明の測定対象となる被検液は、少なくとも、糖化タンパク質を含有する被検液であれば如何なるものを用いても良いが、好ましくは、血液成分、例えば全血、血球、赤血球、溶血液、血清、血漿若しくは尿等が挙げられる。本発明の測定対象となるタンパク質としては臨床検査上有用なタンパク質であれば何れのタンパク質を測定しても良いが、好ましくは血中に存在するタンパク質であり、例えばアルブミン又はヘモグロビン等が挙げられる。

【0011】本発明の対象となるタンパク質の定量方法は、対象となるタンパク質を正確に測定できる方法であればいかなる方法を用いても良い。例えば対象となるタンパク質がアルブミンである場合には、公知のアルブミンを測定する方法であれば如何なる方法を用いても良い。このような方法には、例えばブロムクレゾールグリーン（以下BCGと略す。）、ブロムクレゾールパープル（以下BCPと略す。）、ブロモフェノールブルー（以下BPBと略す。）、メチルオレンジ（以下MOと略す。）、または2-(4'-ヒドロキシベンゼンゾ)安息香酸（以下HABAと略す。）等のアルブミン特異的な色素を用いる

方法等が挙げられる。さらにまた、対象となるタンパク質がヘモグロビンである場合には、公知のヘモグロビンを測定する方法であれば如何なる方法を用いても良い。このような方法には、例えばメトヘモグロビン法、シアシメントヘモグロビン法、アザイドメトヘモグロビン法、緑色発色团形成法またはオキシヘモグロビン法等が挙げられる。緑色発色团形成法とは、緑色発色团形成試薬とヘモグロビンを反応せしめ、安定な生成物（緑色発色团）を形成する方法であり、緑色発色团は英國特許公開第2052056号に記述されるアルカリ性ヘマチンD-575と同様な吸収スペクトルを有する。

【0012】本発明に使用しうるプロテアーゼは、被検液に含まれる対象となるタンパク質に有効に作用するものであればいかなるものを用いても良く、例えば動物、植物、微生物由来のプロテアーゼ等が挙げられる。具体的な例を以下に示す。しかし、これらは1例に過ぎず、なんら限定されるものではない。動物由来のプロテアーゼの例としては、エラスターーゼ(Elastase)、トリプシン(Tripsin)、キモトリップシン(Chymotrypsin)、ペプシン(Pepsin)、牛臍臓プロテアーゼ、カテプシン(Catpsin)、カルパイン(Calpain)、プロテアーゼタイプ-I、-XX(以上、シグマ社製)、アミノペプチダーゼM(AminopeptidaseM)、カルボキシペプチダーゼA(CarboxypeptidaseA)(以上、ベーリングー・マンハイム社製)、パンクリアチニン(Pancreatin:和光純薬社製)等が挙げられる。植物由来のプロテアーゼの例としては、カリクレイン(Kallikrein)、フィシン(Ficin)、パパイン(Papain)、キモパパイン(Chimopapain)、ブロメライン(Bromelain)(以上、シグマ社製)、パパインW-40、ブロメラインF(以上、天野製薬社製)等が挙げられる。

【0013】微生物由来のプロテアーゼの例としては下記(1)～(14)が挙げられる。

(1) バチルス(Bacillus)属由来プロテアーゼ；ズブチリシン(Subtilisin)、プロテアーゼタイプ-VIII、-IX、-X、-XV、-XXIV、-XXVII、-XXXI(以上、シグマ社製)、サーモリシン(termolysin)(以上、和光純薬社製)、オリエンターゼ-90N、-10NL、-22BF、-Y、-5BL、ヌクレイン(以上、阪急バイオインダストリー社製)、プロレザー、プロテアーゼ-N、-NL、-S「アマノ」(以上、天野製薬社)、GODO-BNP、-BAP(以上、合同酒清社精製)、プロチン-A、-P、デスキン、デピレイス、ビオソーカ、サモアーゼ(以上、大和化成社製)、トヨチームNEP(東洋紡績社製)、ニュートラーゼ、エスペラーゼ、サビナーゼ、デュラザイム、バイオフィードプロ、アルカラーゼ、NUE、ピラーゼ、クリアーレンズプロ、エバラーゼ、ノボザイム-FM、ノボラン(以上、ノボノルディスクバイオインダストリー社製)、エンチロン-NBS、-SA(以上、洛東化成工業社製)、アルカリプロテアーゼGL440、オプティクリーン-MB75、プラ

ス、-L1000、-ALP440(以上、協和発酵社製)、ナガーゼ(Nagarse)、ビオプラーゼAPL-30、SP-4FG、XL-416F、AL-15FG(以上、ナガセ生化学工業社製)、アロアーゼAP-10、プロテアーゼYB、(以上、ヤクルト薬品工業社製)、コロラーゼ-N、-7089、ベロンW(以上、樋口商会社製)、キラザイムP-1(ロシュ社製)等。

【0014】(2) アスペルギルス(Aspergillus)由来プロテアーゼ；プロテアーゼタイプ-XIII、-XIX、-XXIII(以上、シグマ社製)、スマチーム-MP、-AP、-LP、-FP、-PL、エンザイムP-3(以上、新日本化学工業株式会社製)、オリエンターゼ-20A、-ONS、-ON5、テトラーゼS(以上、阪急バイオインダストリー社製)、ニューラーゼA、プロテアーゼ-A、-P、-M「アマノ」(以上、天野製薬社)、IP酵素、モルシンF、AOプロテアーゼ(以上、キッコーマン社製)、プロチン-F、-FN、-FA(以上、大和化成社製)、デナブシン2P、デナチーム-S A-7、-AP、デナザイムAP(以上、ナガセ生化学工業社製)、プロテアーゼYP-SS、パンチダーゼ-NP-2、-P(以上、ヤクルト社製)、サカナーゼ(科研ファルマ社製)、フレーバーザイム(ノボノルディスクバイオインダストリー社製)、ベロンPS(樋口商会社製)等。

【0015】(3) リゾパス(Rhizopus)由来プロテアーゼ；プロテアーゼタイプXVIII(シグマ社製)、ペプチダーゼR、ニューラーゼF(以上、天野製薬社製)、XP-415(ナガセ生化学工業社製)等。

(4) ペニシリウム(Penicillium)由来プロテアーゼ；PD酵素(キッコーマン社製)等。

(5) ストレプトマイセス(Streptomyces)由来プロテアーゼ；プロテアーゼタイプXIV；別称Pronase、-XXI(以上、シグマ社製)、アクチナーゼ-AS、-AF(以上、科研ファルマ社製)、タシナーゼ(協和発酵社製)、alkalofilicproteinase(東洋紡社製)等。

(6) スタフィロコッカス(Staphylococcus)由来プロテアーゼ；プロテアーゼタイプXVII(シグマ社製)等。

【0016】(7) クロストリジウム(Clostridium)由来プロテアーゼ；クロストリパイン(Clostripain)、ノンスペシフィックニュートラルプロテアーゼ(non-specific nontatural proteinase)(以上、シグマ社製)等。

(8) リソバクター(Lysobacter)由来プロテアーゼ；エンドプロテイナーゼLys-C(シグマ社製)等。

(9) グリフォラ(Grifola)由来プロテアーゼ；メタロエンドペプチダーゼ(Metalloendopeptidase；シグマ社製)等。

(10) 酵母(Yeast)由来プロテアーゼ；プロテイナーゼA(proteinaseA；シグマ社製)、カルボキシペプチダーゼY(CarboxypeptidaseY；ベーリングー・マンハイム社製)等。

【0017】(11)トリチラチウム(Tritirachium)由来プロテアーゼ；プロテイナーゼK(ProteinaseK；シグマ社製)等。

(12) サーマス (*Thermus*)由来プロテアーゼ；アミノペプチダーゼT (*Aninopeptidase T* ; ベーリンガー・マンハイム社製) 等。

(13) シュードモナス (*Pseudomonas*)由来プロテアーゼ；エンドプロテイナーゼAsp-N (*Endoproteinase Asp-N* ; 和光純薬社製) 等。

(14) アクロモバクター (*Achromobacter*)由来プロテアーゼ；リジルエンドペプチダーゼ (*Lysylendopeptidase e*)、アクロモペプチダーゼ (以上、和光純薬社製) 等。

【0018】また、測定対象であるタンパク質がアルブミンである場合にはバチルス属及びストレプトマイセス属の微生物由来プロテアーゼがヒトアルブミンに対する

<基質> 0.6% ミルクカゼイン (メルク社製)

<酵素溶液> 10PU～20PUに希釈

<酵素希釈溶液> 20mM 酢酸緩衝液 pH7.5

1mM 酢酸カルシウム

100mM 塩化ナトリウム

<反応停止液> 0.11M トリクロル酢酸

0.22M 酢酸ナトリウム

0.33M 酢酸

【0020】<操作> プロテアーゼ溶液を10～20PU/ml になるように酵素希釈溶液にて溶解し、この液1ml を試験管に取り30℃に加温する。あらかじめ30℃に加温しておいた基質溶液5ml を加え正確に10分後反応停止液5ml を添加し反応を停止する。そのまま30℃30分加温を続け沈殿を凝集させ、東洋ろ紙N0.131(9cm) でろ過を行い、ろ液を得る。プランク測定はプロテアーゼ溶液 1ml を試験管に取り30℃に加温し、まず反応停止液5ml を添加し続いて基質溶液 5ml を添加後同様に凝集、ろ過を行う。ろ液 2ml を0.55M 炭酸ナトリウム溶液 5ml、3 倍希釈フオリン試薬 1ml を加え30℃、30分反応後 660nm の吸光度を測定する。酵素作用を行った吸光度からプランク測定の吸光度を差し引いた吸光度変化、△Aを求め、別に作成した作用標準曲線より酵素活性を求める。

【0021】<標準作用曲線作成法> 約50PU/ml に調整した酵素溶液を希釈し2～50PU/ml の一連の希釈倍率を持った酵素溶液を作成し上記操作を行い、得られた△A を縦軸に希釈倍数を横軸にプロットする。一方L-チロシンを0.2N塩酸に0.01% の濃度に溶解しその1ml に0.2N塩酸10ml 加えたものを標準チロシン溶液とする (チロシン濃度9.09μg/ml)。標準チロシン溶液2ml と0.2N塩酸2ml についてそれぞれ上記測定操作を行い、得られた△A がチロシン18.2μg に相当する。この△A を前記グラフ上にとり、その点から横軸に垂線を下ろし横軸との交点が10PU/ml に相当する。

【0022】本発明に使用しうる糖化アミノ酸に作用する酵素としては、前記プロテアーゼの作用により、被検液に含まれる糖化タンパク質から生成される糖化アミノ酸若しくは糖化ペプチドに有効に作用し、実質的に糖化タンパク質が測定できる酵素であれば如何なるものを用

作用が大きい為より好ましく、また測定対象であるタンパク質がヘモグロビンで有る場合にはバチルス属、アスペルギルス属、ストレプトマイセス属、トリチラチウム属由来のプロテアーゼがヒトヘモグロビンに対する作用が大きい為により好ましい。

【0019】本発明に用いることの出来るプロテアーゼの活性測定法を下記に示す。

<<プロテアーゼの活性測定方法>> 下記の測定条件で30℃、1 分間に 1μg のチロシンに相当する星色を示すプロテアーゼ活性を1PU (proteolytic Unit) と表示する。

いても良い。例えば、糖化アルブミンを測定対象とする場合には、ε-アミノ基が糖化された糖化アミノ酸若しくはペプチドに作用する酵素が好ましく、また糖化ヘモグロビンを測定対象とする場合には、α-アミノ基が糖化された糖化アミノ酸若しくはペプチドに作用する酵素が好ましい。

【0023】ε-アミノ基が糖化された糖化アミノ酸に作用する酵素の例としては、ギベレラ (*Gibberella* 属またはアスペルギルス (*Aspergillus*) 属 (例えばIFO-6365、-4242、-5710 等) 由来フルクトサミンオキシダーゼ、カンジダ (*Candida*) 属由来フルクトシルアミンデグリカーゼ、ペニシリウム (*Penicillium*) 属 (例えばIFO-4651、-6581、-7905、-5748、-7994、-4897、-5337 等) 由来フルクトシルアミノ酸分解酵素、フサリウム (*Fusarium*) 属 (例えばIFO-4468、-4471、-6384、-7706、-9964、-9971、-31180、-9972 等) 由来、アクリモニウム (*Acremonium*) 属由来又はデバリオマイセス (*Debaromyces*) 属由来ケトアミンオキシダーゼ等が挙げられる。

【0024】α-アミノ基が糖化された糖化アミノ酸若しくはペプチドに作用する酵素の例としては、上記ε-アミノ基が糖化された糖化アミノ酸若しくはペプチドに作用する酵素及びコリネバクテリウム (*Corynebacterium*) 由来の酵素が挙げられ、α-アミノ基が糖化された糖化アミノ酸若しくはペプチドに特異的に作用する酵素の例としてはコリネバクテリウム属由来の酵素が挙げられる。

【0025】さらに、α-アミノ基及びε-アミノ基が糖化された糖化アミノ酸若しくはペプチドに作用し、プロテアーゼと共に存させた状態でも充分な活性を有する酵素

の例としては、遺伝子組み替え型フルクトサミンオキシダーゼ (R-FOD ; 旭化成工業社製) が挙げられる。

【0026】糖化アミノ酸に作用する酵素の活性は下記の方法にて測定する。

<<糖化アミノ酸に作用する酵素の活性測定法>>

<反応液の組成>

50mM トリス緩衝液 pH7.5

0.03% 4-アミノアンチピリン (以下4-AAと略す。; 和光純薬社製)

0.02% フェノール (和光純薬社製)

4.5U/ml パーオキシダーゼ (以下 PODと略す。; シグマ社製)

1.0mM α -カルボベンズオキシ- ϵ -D-フルクトシル-L-リジン若しくはフルクトシルバリン (ハシバラの方法に基づき合成、精製した。Hashiba H, J. Agric. Food Chem. 24 : 70, 1976. 以下 ZFLと略す。)

【0027】上記の反応液1ml を小試験管に入れ、37°C -5 分間予備加温した後、適当に希釈した酵素液0.02ml を添加して攪拌し、反応を開始する。正確に10分間反応の後に0.5%のSDSを2ml 添加して反応を停止し、波長500nm の吸光度を測定する (As)。またブランクとして酵素液のかわりに蒸留水0.02ml を用いて同一の操作を行って吸光度を測定する (Ab)。この酵素作用の吸光度(As)と盲検の吸光度(Ab)の吸光度差 (As-Ab) より酵素活性を求める。別にあらかじめ過酸化水素の標準溶液を用いて吸光度と生成した過酸化水素との関係を調べ、37°C-1 分間に $1\mu M$ の過酸化水素を生成する酵素量を1Uと定義する。計算式を下記に示す。

酵素活性 (U/ml) = (As-Ab) \times 2.32 \times 酵素の希釈率

【0028】本発明に使用しうるグロブリン成分選択的なプロテアーゼ阻害剤は、例えば血液成分のごとき、グロブリン成分及びグロブリン成分以外のタンパク質を含有する被検液に、プロテアーゼをグロブリン成分選択的なプロテアーゼ阻害剤存在下作用せしめ、主にグロブリン成分以外のタンパク質から、糖化アミノ酸に作用する酵素の基質を生じうるグロブリン成分選択的なプロテアーゼ阻害剤であれば、如何なるものも用いても良い。その例として金属イオン、プロテインA、プロテインGなどが挙げられる。

【0029】金属イオンとしては、例えば、遷移金属、III族、IV族の金属イオンが好ましく、遷移金属イオンとしては亜鉛、ニッケル、鉄、銅、コバルトイオンがより好ましく、III族金属イオンとしてはアルミニウム、ガリウムイオンがより好ましく、IV族金属イオンとしては錫、鉛イオンがより好ましい。さらに金属の毒性、血清との相互作用による沈殿の生成等を考慮すると、アルミニウム若しくはニッケルイオンが最も好ましい。尚、これらの金属イオンは単独若しくは組み合わせて用いても良く、また金属イオンを添加するには、例えば、その金属イオン放出能力のある塩の水溶液を用いれば良い。

【0030】本発明の糖化タンパク質割合の定量方法における液組成については、タンパク質定量試薬、プロテアーゼを用いたタンパク質の分解試薬、生成した糖化アミノ酸若しくはペプチドの定量を行う糖化アミノ酸定量試薬を同一反応槽中で使用できるように適宜組み合わせれば良い。

【0031】本発明に使用しうるタンパク質定量試薬組成は、公知のタンパク質定量試薬を用いれば良い。例えばアルブミンを定量する目的では、前記BCG、BCP、BPB、MO、チバクロンブルー誘導体若しくはHABA等のアルブミン定量色素を用いることが出来、例えばHABAを用いる場合には pH3.0~10.0、好ましくは pH4.0~9.0 において、0.001~10%、好ましくは0.01~1%の濃度で使用すれば良く、480~550nm の吸光度変化を測定し既知の濃度の標準品の発色と比較すればよい。また同様にBCPを用いる場合には、pH 4.0~8.0、好ましくはpH 4.5~7.5 に於いて着色を押さえる界面活性剤、例えばBrJi35 等を0.01~5%、好ましくは0.05~1%の共存下、0.0001~0.2%、好ましくは0.0005~0.1%で使用すれば良く、600nm 付近の吸光度変化を測定し既知濃度の標準品の発色と比較すれば良い。

【0032】また例えばヘモグロビンを定量する目的には、公知のヘモグロビン定量法、例えば、前記メトヘモグロビン法、シアノメトヘモグロビン法、アザイドメトヘモグロビン法、緑色発色団形成法またはオキシヘモグロビン法等を用いることが出来、メトヘモグロビン法を用いる場合には、例えばフェリシアン化カリウム等の酸化剤を、シアノメトヘモグロビン法を用いる場合には例えばシアノ化カリウム等のシアニオンを、アザイドメトヘモグロビン法を用いる場合には例えばアジ化ナトリウム等のアザイドを、緑色発色団形成法を用いる場合には例えば非イオン性界面活性剤等の緑色発色団形成試薬を、公知の方法で添加するれば良く、またオキシヘモグロビン法を用いる場合には、例えば検体を蒸留水で希釈しオキシヘモグロビンに変換後540nm の吸収を測定ば良い。またヘモグロビンの変性を防ぐ目的で界面活性剤、例えば少なくとも硫酸基を有する界面活性剤、及び/または非イオン性界面活性剤、及び/又は両イオン性界面活性剤を好ましくは0.001~10% の濃度で添加すると好ましい。

【0033】本発明に使用しうるタンパク質の分解試薬組成としては、使用するプロテアーゼの至適pHを考慮し、反応が効率よく進行するようにpH及びプロテアーゼ濃度を決定し、必要であればその後グロブリン成分選択的なプロテアーゼ阻害剤を有効な濃度になるよう適宜調製して添加すればよい。

【0034】例えば前記プロテアーゼタイプXXVII(シグマ社製)はpHが7~10付近でタンパク質分解活性が強く、反応のpHは7~10を選択できる。またプロテアーゼ添加濃度は実際に使用される反応時間中に被検液中の

糖化タンパク質を十分に分解し得る濃度で有れば良く、500～50万PU/mlが好ましく、1000～10万PU/mlがより好ましい。さらにグロブリン成分選択性的なプロテアーゼ阻害剤として例えばアルミニウムイオンを使用する場合、好ましくは0.05mM以上、実質的にグロブリン成分へのプロテアーゼ作用が無くなる0.3mM以上がさらに好ましく、また被検液添加時の濁りが2mM以上から顕著になることから、0.05mM～2mMが好ましく、0.1mM～1mMがさらに好ましい。

【0035】本発明に使用しうる糖化アミノ酸定量試薬組成については、使用する糖化アミノ酸に作用する酵素の至適pHを考慮し、反応が効率よく進行するようにpHを選択しその後、糖化アミノ酸に作用する酵素量を決定すればよい。例えばR-FOD（旭化成工業社製）を使用する場合、活性を有する領域がpH5.0～11と広く、反応のpHは5.0～11を選択できる。また酵素添加濃度は、使用される反応液中で糖化アミノ酸を十分に検出し得る濃度で有れば良く、0.01～1000U/mlが好ましく、0.1～500U/mlがより好ましい。

【0036】また本発明に使用しうる糖化アミノ酸に作用する酵素作用の検出は、例えばデヒドロゲナーゼを用いた場合には補酵素の変化量を、例えば補酵素としてニコチンアミドアデニジヌクリオチド（以下NADと略す。）を用た場合には、還元型補酵素である還元型NADをその極大吸収波長域である340nm付近の波長にて比色計で直接定量するか、若しくは生じた還元型補酵素を各種ジアフォラーゼ、またはフェナジンメトサルフェート（以下PMSと略す。）、メトキシPMS、ジメチルアミノベンゾフェノキサジニウムクロライド（メルドラブルー）等の電子キャリアー及びニトロテトラゾリウム、2-(4-インドフェニル)-3-(4-ニトロフェニル)-5-(2,4ジスルフォフェニル)-2H-テトラゾリウム、モノナトリウム塩（WST-1）～2-(2-メトキシ-4-ニトロフェニル)-3-(4-ニトロフェニル)-5-(2,4-ジスルフォフェニル)-3-(4-ニトロフェニル)-5-(2,4-ジスルフォフェニル)-2H-テトラゾリウム、1ナトリウム塩（WST-8）（水溶性テトラゾリウム塩シリーズ1～8）（以上、同人化学研究所社製）に代表される各種テトラゾリウム塩等の還元系発色試薬を用い間接的に定量してもよく、またこれ以外の公知の方法により直接、間接的に測定してもよい。

【0037】また例えばオキシダーゼを用いた場合には、酸素の消費量または反応生成物の量を測定することが好ましい。反応生成物として、例えばフルクトサミンオキシダーゼを用いた場合には反応により過酸化水素及びグルコソンが生成し、過酸化水素及びグルコソン共に公知の方法により直接、間接的に測定する事が出来る。上記過酸化水素の量は、例えばPOD等を用いて色素等を生成し、発色、発光、蛍光等により定量しても良く、カタラーゼ等を用いてアルコールからアルデヒドを生成せ

しめて、生じたアルデヒドの量を定量しても良い。

【0038】過酸化水素の発色系は、PODの存在下で4-AA若しくは3-メチル-2-ベンゾチアゾリノンヒドラゾン（以下MBTHと略す。）等のカップラーとフェノール等の色原体との酸化縮合により色素を生成するトリンダー試薬、PODの存在下で直接酸化呈色するロイコ型試薬等を用いることが出来る。トリンダー型試薬の色原体としては、フェノール誘導体、アニリン誘導体、トルイジン誘導体等が使用可能であり、具体例としてN,Nジメチルアニリン、N,Nジエチルアニリン、2,4ジクロロフェノール、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3,5ジメトキシアニリン（DAOS）、N-エチル-N-スルホプロピル-3,5ジメチルアニリン（MAPS）、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3,5-ジメチルアニリン（MAOS）、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-m-トルイジン（TOOS）、N-エチル-N-スルホプロピル-3,5ジメトキシアニリン（ALPS）、N-エチル-N-スルホプロピル-3,5-ジメトキシアニリン（DAPS）、N-スルホプロピル-3,5-ジメトキシアニリン（HDAPS）、N-エチル-N-スルホプロピル-m-トルイジン（TOPS）、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-m-アニシン（ADOS）、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)アニリン（ALOS）、N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3,5-ジメトキシアニリン（HDAOS）、N-スルホプロピル-3,5-ジメトキシアニリン（HALPS）（以上、同人化学研究所社製）等が挙げられる。

【0039】またロイコ型試薬の具体例としては、o-ジアニシン、o-トリジン、3,3ジアミノベンジジン、3,3,5,5-テトラメチルベンジジン（以上、同人化学研究所社製）、N-(カルボキシメチルアミノカルボニル)-4,4-ビス(ジメチルアミノ)ビフェニルアミン（DA64）、10-(カルボキシメチルアミノカルボニル)-3,7-ビス(ジメチルアミノ)フェノチアジン(DA67)（以上、和光純薬社製）等が挙げられる。

【0040】さらに蛍光法には、酸化によって蛍光を発する化合物、例えばホモバニリン酸、4-ヒドロキシフェニル酢酸、チラミン、パラクレゾール、シアセチルフルオレスシン誘導体等を、化学発光法には、触媒としてルミノール、ルシゲニン、イソルミノール、ピロガロール等を用いることが出来る。カタラーゼ等を用いてアルコールからアルデヒドを生成せしめて、生じたアルデヒドを定量する方法としては、ハンチ反応を用いる方法や、MBTHとの縮合反応により発色させる方法、若しくはアルデヒドデヒドロゲナーゼを用いる方法等が挙げられる。グルコソンの定量はジフェニルアミン等の公知のアルドース試薬を用いて定量すればよい。

【0041】タンパク質定量試薬、タンパク質分解試薬及び糖化アミノ酸発色試薬を組み合わせる手順としては、例えば、タンパク質定量試薬と糖化アミノ酸定量用

試薬の検出波長が等しくなるように発色試薬の種類を選択し、統いて、タンパク質定量のシグナルが糖化アミノ酸定量のシグナルに影響を与えないように、プロテアーゼの濃度、タンパク質分解及び糖化アミノ酸発色のpHを決定すれば良い。タンパク質定量のシグナルが糖化アミノ酸定量のシグナルに影響を与えないように条件を調整するには、十分量のプロテアーゼを添加することにより、糖化アミノ酸定量試薬を添加する前にタンパク質分解反応を終了させ、タンパク質分解反応に伴うタンパク質定量試薬のシグナル変化が一定になるように調整すれば良い。また例えば、BCP、BCG、BPB 及びMO等のアルブミン定量試薬は、アルカリ性で激しく着色する色素がある為に、タンパク質定量試薬が糖化タンパク質定量に影響を及ぼさないように注意して反応のpHを選択する必要がある。

【0042】また、タンパク質定量試薬と糖化アミノ酸定量試薬の検出波長が等しくなるように設定するには、タンパク質定量色素及び糖化アミノ酸定量色素の吸収極大波長が、同一波長若しくはその近傍であるとよい。近傍とは測定波長において生体成分中のタンパク質及び糖化タンパク質が十分な感度で定量出来る範囲であれば良く、例えばUV～可視領域で検出可能な色素を用いる場合には、健常者の試料(アルブミン量 3.5～5.5/dl、ヘモグロビン12～18g/dl、糖化アルブミン11.6～16.3%、糖化ヘモグロビン 4.3%～5.8 %)から得られる吸光度が、それぞれの試薬において50mAbs以上であればよい。例えばアルブミン糖化割合を定量する場合、アルブミン定量試薬としてHABAを、タンパク質の分解試薬としてアルブミンに高い分解活性を示すプロテアーゼタイプ XXV II (シグマ社製)を、糖化アミノ酸定量用試薬の主成分としてR-FOD(旭化成工業社製)を選択する事が出来、HABAは480～550nm付近でアルブミンの定量が可能であるから、R-FODにより生じた過酸化水素を比色定量するには、例えば 480～550nm付近で十分な感度を有する色素、例えば 400～630nmに吸収極大をもつ色素 (4-AAとT00S等； $\lambda_{max}=555nm$)の組み合わせを選択すれば良い。またHABAを用いる場合には pH4.0～9.0で使用可能であり、この間のpH変動により着色等が見られないとために、統くタンパク質の分解試薬は何れのpHに選択しても良く、糖化アミノ酸定量用試薬はR-FODの作用が強い、pH5.0～10.0の範囲で設定可能である。プロテアーゼ濃度としては 500～50万PU/ml が好ましく、1000～5万PU/ml がより好ましい。

【0043】またHABAの代わりにBCPを用いる場合には、BCP-アルブミンの発色は吸収極大が600nm付近であり、550～630 nmでアルブミンの定量が可能であることから、例えば 550～630 nm付近で十分な感度を有する色素、例えば 480～700nmに吸収極大をもつ色素、MBTHとHALP等の組み合わせ ($\lambda_{max}=582nm$)を選択すれば良い。また BCPは中性以上で激しく着色するために pH4.5～7.

5で使用し、統くタンパク質の分解試薬、糖化アミノ酸定量試薬はpH7.5以下を選択する必要があり、例えば糖化アミノ酸定量試薬は R-FODの至適pHを考慮すると pH 5.0～7.5 の範囲で設定可能である。またHABAの代わりにBCGを用いる場合には、BCG-アルブミンの吸収極大が630nm付近であり、530～670 nmでアルブミンの定量が可能であるから、例えば 530～670nm付近で十分な感度を有する色素、例えば 450～750 nmに吸収極大をもつ色素、例えば4-AAとMAOS等の組み合わせ ($\lambda_{max}=630nm$)を選択すればよい。またBCGはpH5.6以上で激しく着色するために、統くタンパク質の分解試薬、糖化アミノ酸定量試薬はpH5.5以下を選択する必要があり、例えば糖化アミノ酸定量試薬はR-FODの至適pHを考慮すると pH5.0～5.5の範囲で設定可能である。

【0044】さらに、例えばヘモグロビン糖化割合を定量する場合には、ヘモグロビン定量方法としてオキシヘモグロビン法を、タンパク質の分解試薬としてヘモグロビンに高い分解活性を示すプロテアーゼタイプ XIV (シグマ社製)を、糖化アミノ酸定量用試薬の主成分として R-FOD(旭化成工業社製)を選択する事が出来、オキシヘモグロビンは540nm付近に吸収極大を持つことから、R-FODにより生じた過酸化水素を比色定量するには、例えば 540nm付近で十分な感度を有する色素、例えば 570～610 nmに吸収極大を持つ色素、4AAとT00S等の組み合わせ ($\lambda_{max}=555$)を用いれば良い。またオキシヘモグロビンはアルカリ性ではメト化が起こり吸収が変化することから、界面活性剤の存在下、酸性～中性付近での測定が好ましく、例えばTritonX-100 0.01～10%の存在下、pH 5.0～9.5付近でヘモグロビンの定量を行えば良く、統くプロテアーゼ反応及び糖化アミノ酸の検出反応も5.0～9.5付近で行うと良い。またプロテアーゼ濃度としては 500～10万PU/ml が好ましく、1000～5万PU/ml がより好ましい。タンパク質定量試薬、タンパク質分解試薬、糖化アミノ酸定量試薬のpHは液状であればそのまま、液状凍結品であれば溶解後、凍結乾燥品であれば蒸留水等に溶解後、市販のpHメーターで測定すればよい。

【0045】以上のことから、本発明に於ける糖化タンパク質割合定量用組成物としては、タンパク質定量用試薬、プロテアーゼ、糖化アミノ酸に作用する酵素を含有するものとして調製すれば良く、また、グロブリン成分の影響を受けない糖化タンパク質割合定量用組成物としては、タンパク質定量試薬、プロテアーゼ、グロブリン成分選択性的なプロテアーゼ阻害剤及び糖化アミノ酸に作用する酵素を含有するものとして調製すれば良く、例えば液状品及び液状品の凍結物あるいは凍結乾燥品として提供できる。

【0046】さらに本発明に基づく糖化タンパク質割合定量試薬組成には、例えば界面活性剤、塩類、緩衝剤、pH調製剤や防腐剤などを適宜選択して添加しても良い。適宜な添加物において、界面活性剤としてはポリオキシ

エチレンアルキルエーテル類〔例えばトリトンX-100、ポリオキシエチレン(23)ラウリルエーテル(以上、ナカライテスク社製)〕、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル類(ツイーン20、ツイーン40、ツイーン60、ツイーン80、ツイーン85;以上、関東化学社製)、ポリオキシエチレングリセリン脂肪酸エステル類、ポリオキシエチレンソルビット脂肪酸エステル類、ポリオキシエチレンアルキルフェニルホルムアルデヒド縮合物、ポリオキシエチレンひまし油、ポリオキシエチレンステロール類、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレンアルキルエーテル類、ポリオキシエチレンラノリン類、ポリオキシエチレンアルキルアミン・脂肪酸アミド類、ポリオキシエチレンアルキルエーテルリン酸・リン酸塩類、ポリオキシエチレンアルキルエーテル硫酸塩類、ポリグリセリン脂肪酸エステル類、グリセリン脂肪酸エステル類、プロピレングリコール脂肪酸エステル類、ソルビタン脂肪酸エステル類、Nアシルアミノ酸塩類、アルキルエーテルカルボン酸塩類、アルキルリン酸塩、Nアシルタウリン酸塩、スルホン酸塩、アルキル硫酸、酢酸ベタイン型両性界面活性剤、イミダゾリン型両性界面活性剤、レシチン誘導体(以上、日光ケミカルズ社製)、アデカトール720N、アデカトールB-795、アデカトールS-0-120、アデカノールB-795(以上、旭電化工業社製)、ポリエチレングリコール類、ポリエチレングリコールラウリルエーテル、ポリエチレングリコールイソオクチルフェニルエーテル、ポリプロピレングリコール、ポリビニルアルコール、トリトンX-305、トリトンX-114、トリトンX-405、トリトンWR-1339(以上、ナカライトスク社製)等の0.01~10%、好適には0.05~5%、各種金属塩類、例えば塩化リチウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化マンガン、塩化コバルト、塩化亜鉛、塩化カルシウム等の1mM~5M、好適には10mM~1M、各種緩衝液、例えばトリス-塩酸緩衝液、グリシン-NaOH緩衝液、磷酸緩衝液、グッドの緩衝液等の10mM~2M、好適には20mM~1M、各種防腐剤、例えばアジ化ナトリウムの0.01~10%、好適には0.05~1%を適宜添加すればよい。

【0047】このようにして調製された本発明の糖化タンパク質割合定量用組成物(試薬)によって、被検液中の糖化タンパク質割合を定量するには、タンパク質定量用試薬に被検液0.001~1.0mLを加え、37°Cにて反応させ、一定時間後の変化した吸光度を測定し、次いでタンパク質分解試薬0.001~1.0mLを加え37°Cにてタンパク質分解反応を行い、次いで糖化アミノ酸定量試薬0.001~1.0mLを加え37°Cにて吸光度変化を測定すればよい。またタンパク質定量反応は、タンパク質分解反応に比して極めて早いことから、タンパク質定量試薬とタンパク質分解試薬を同時に添加し、素早くタンパク質の定量を行い、同時にタンパク質分解反応を進行させても良く、またタンパク質分解試薬と糖化アミノ酸定量試薬を同時に添加してタンパク質分解反応と糖化アミノ酸定量反応

を同時に行っても良い。この場合、既知濃度の対象となるタンパク質濃度及び糖化タンパク質濃度の標準タンパク質を測定した場合の吸光度変化と比較すれば、被検液中の対象となるタンパク質濃度及び対象となる糖化タンパク質濃度を求めることが出来、この割合を取ることにより糖化タンパク質割合を算出する事が出来る。

【0048】

【発明の実施の形態】ついで、本発明の実施例を詳しく述べるが、本発明は何らこれにより限定されるものではない。

【実施例1】

アルブミン定量色素に及ぼすpHの影響

<試薬組成>

アルブミン定量色素	HABA	0.0167%
	BCG	0.00167%
	BCP	0.00167%
緩衝液 pH4、5、6	クエン酸緩衝液	67mL
pH7、8、9	トリス緩衝液	67mL
界面活性剤	Brij135	1%

【0049】<基質溶液>

HSA 基質溶液; Albumin Human ; Essentially Globulin Free; 25mg/mL、糖化アルブミン率=31.9%、フルクトサミン値=265 μmol/L(シグマ社製; 基質溶液中のアルブミンの濃度はアルブミン測定キット(アルブミンII-HA テストワコー; 和光純薬社製)にて定量し、糖化アルブミン率は糖化アルブミン測定計(GAA-2000; 京都第一科学社製)にて測定し、フルクトサミン値はフルクトサミン測定キット(オートワコー フルクトサミン(和光純薬社製)にて測定した。)

【0050】<操作>反応液1.2mLを試験管にとり0.06mLのHSA 基質溶液若しくは蒸留水を添加する。攪拌後室温で1分以上放置し分光光度計にて吸収スペクトルを測定する。結果は図1~3に記載した。図1~3から分かるよう、HABAはpH4.0~9.0(図1)で、BCGはpH5.5以下(図2)で、BCPはpH4.5~7.5(図3)にて使用可能である。また試料の代わりに蒸留水を加えたプランクの吸光度もこの範囲で低いことから、タンパク質定量試薬に直接添加される糖化タンパク質定量試薬のpHも、混合後に、HABAを用いた場合にはpH4.0~9.0に、BCGを用いた場合にはpH5.5以下に、BCPを用いた場合にはpH4.5~7.5になるよう調整すればよい。さらに同様に界面活性剤の存在下ヘモグロビンの540nmの発色を様々なpHにて測定した結果、pH5.0~9.5に於いて使用可能であった。

【0051】

【実施例2】

アルブミン定量発色に及ぼすプロテアーゼ濃度の影響

<試薬組成>

100mM トリス緩衝液	pH8.5
0.017% HABA	

166mg/dl HSA (実施例1記載のHSA)

【0052】<操作>上記反応液 1.0mlを吸光度計セルに分注し、37°Cに加温する。温度が一定になったところで 545nmの測光を開始し、測光開始後1 分後に濃度の異なるプロテアーゼ溶液 (プロテアーゼタイプXXVII ; シグマ社製) 0.1ml を添加し継続して545nm の吸光度を測定した。結果を図4に示す。

アルブミン糖化割合の測定1

<R-1 >	10mM Tris 緩衝液 pH8.5
	8mM 4-AA (和光純薬社製)
	15U/ml POD(シグマ社製)
	10mg/ml プロテアーゼタイプ XXVII (シグマ社製、1 万PU/ml)
	1% (3-[3-cholamidopropyl]-dimethylammonio) -2-hydroxy
	-1-propanesulfonate ; 以下CHAPSOと略す。)
	0.6mM AlCl ₃
	0.017% HABA

【0055】

<R-2 >	150mM Tris緩衝液 pH8.5
	12mM TOS
	24U/ml FOD

【0056】<基質溶液>実施例1記載のHSA 基質溶液 (2.5g/dl)を調製し、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 倍濃度の試料を作成した。

【0057】<操作>上記R-1 (タンパク質定量試薬、タンパク質分解試薬)270μl をセルにとり、37°Cにインキュベートし、試料 9μl を添加、攪拌し37°Cにて反応を開始した。反応開始後10秒後にタンパク質定量値を求める目的で545nm の吸光度 (A1) を測定し、引き続き37°Cにてタンパク質分解反応を継続した。反応開始後 270 秒(4.5分) 後に545nm の吸光度 (A2) を測定し、反応開始後 300秒(5分) 後に上記R-2を90μl添加、攪拌し、さらに37°C 300秒 (5分) 間反応を行い、545nm の吸光度 (A3) を測定した。同様にブランク試料の測定を行い、A1ブランク、A2ブランク、A3ブランクを測定した。アルブミン定量の吸光度変化 (ΔA(A1b)) はA1-A1ブランク、糖化タンパク質定量の吸光度変化 (ΔA(GA)) は (A3-A2) - (A3ブランク-A2ブランク) により計算した。

HSA 濃度1.0 倍、0.6 倍及びブランクの反応曲線を図5

アルブミン糖化割合の測定2

<R-1 >	10mM Tris 緩衝液 pH7.25
	8mM 4-AA (和光純薬社製)
	15U/ml POD(シグマ社製)
	10mg/ml アルカリプロテアーゼ (長瀬産業社製、3000PU/ml)
	1% CHAPSO
	0.4mM AlCl ₃
	10mM EDTA
	0.001675% BCP
	0.5% Tween20

【0060】

【0053】図4から分かるようにプロテアーゼ最終濃度500PU/ml以上で 600秒 (10分) 以内にアルブミン発色のプロテアーゼ作用による変化が終了し、プロテアーゼ最終濃度500PU/ml以上にて遅くとも10分間後に続く糖化タンパク質測定を行えば良いことが明白であった。

【0054】

【実施例3】

に、測定結果を図6に示す。

【0058】図5から分かるように反応開始直後にアルブミン定量試薬の反応により発色が確認され、その後プロテアーゼの反応によりアルブミンが分解され200 秒近辺ではほぼ試料添加前のレベルに落ちていることから、反応開始直後にアルブミン定量を行えば良く、200 秒以降に続く糖化アミノ酸定量を行うことにより、アルブミン定量に由来する吸光度変化の影響を受けないことが明らかであった。また図6から分かるように、HSA 標準品を希釈したサンプルはアルブミン定量 (□) 、糖化アルブミン酸定量 (○) 共に良好な直線性を示し、連続で同一反応槽中で測定しても問題なく定量が行えることが明確となった。さらに同一の試薬を用いてヒトグロブリン (シグマ社製；コーンフラクションII、III)をヒト血清濃度 (1.69mg/ml)になるように溶かし、同様の測定を行った結果、アルブミン定量、糖化アルブミン酸定量共に検出限界以下であり、糖化アルブミンのみを選択的に測定していることが明白であった。

【0059】

【実施例4】

<R-2> 150mM Tris緩衝液 pH8.5
12mM TOOS
24U/ml POD

【0061】<基質溶液>実施例1記載のHSA 基質溶液(2.5g/dl)を調整し、0.0、0.25、0.5、0.75、1.0倍濃度の試料を作成した。

【0062】<操作>上記R-1 (タンパク質定量試薬、タンパク質分解試薬)270μl をセルにとり、37°Cにインキュベートし、試料 9μl を添加、攪拌し37°Cにて反応を開始した。反応開始後10秒後にタンパク質定量値を求める目的で600nm の吸光度(A1)を測定し、引き続き37°Cにてタンパク質分解反応を継続した。反応開始後4.5分後に600nm の吸光度(A2)を測定し、反応開始後5 分後に上記R-2 を90μl 添加、攪拌し、さらに37°C 5分間反応

ヘモグロビン糖化割合の測定

<R-1> 10mM Tris緩衝液 pH8.5
8mM 4-AA (和光純薬社製)
15U/ml POD(シグマ社製)
200mg/ml プロテアーゼタイプXIV (シグマ社製、13mU(Hb)/ml)
1% TritonX-100
0.6mM AlCl₃

【0065】

<R-2> 150mM Tris緩衝液 pH8.5
12mM TOOS
24U/ml POD

【0066】<基質溶液>

Hb基質溶液: Hemoglobin Human; 5.5g/dl 、糖化ヘモグロビン率; HbA1c = 4.5% [シグマ社製; HbA1c 値は糖化ヘモグロビン計(ハイオートエーワンシーHA-8150 ; 京都第一科学社製)にて測定した。]

Hb基質溶液(5.5g/dl)を調整し、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0倍濃度の試料を作成した。

【0067】<操作>上記R-1 (タンパク質定量試薬、タンパク質分解試薬)540μl をセルにとり、37°Cにインキュベートし、試料18μl を添加、攪拌し37°Cにて反応を開始した。反応開始後50分後にヘモグロビン定量値を求める目的で545nm の吸光度(A1)を測定し、反応開始後60分後に反応液を排除分子量1万の膜(ウルトラフリードラフターMC ; ミリポア社製)で沪過した。糖化アミノ酸の定量は、沪液279μl の吸光度(A2)を測定後、上記R-2 を90μl 添加、攪拌し、さらに37°C 5分間反応を行い、545nm の吸光度(A3)を測定した。同様にプランク試料の測定を行い、A1プランク、A2プランク、A3プランクを測定した。ヘモグロビン定量の吸光度変化はA1-A1プランク、糖化タンパク質定量の吸光度変化は(A3-A2)-(A3プランク-A2プランク)により計算した。測定結果を図8 (ヘモグロビン定量値は吸光度変化に1/10を乗じて表示した。) に示す。図8から分かるように、アルブミン同様、ヘモグロビン定量(□)、糖化ヘモグロビン定量(○)共に良好な直線性を示し、同一反応槽中で測

を行い、600nm の吸光度(A3)を測定した。同様にプランク試料の測定を行い、A1プランク、A2プランク、A3プランクを測定した。アルブミン定量の吸光度変化はA1-A1プランク、糖化タンパク質定量の吸光度変化は(A3-A2)-(A3プランク-A2プランク)により計算した。測定結果を図7に示す。

【0063】図7から分かるように、HABA同様 BCPを用いてもHSA 標準品を希釈したサンプルはアルブミン定量(□)、糖化アルブミン酸定量(○)共に良好な直線性を示し、同一反応槽中で測定しても問題なく定量が行えることが明確となった。

【0064】

【実施例5】

定しても問題なく定量が行えることが明確となった。

【0068】さらに同一の試薬を用いてヒトグロブリン(シグマ社製; コーンフラクションII、III)をヒト血清濃度(1.69mg/ml)になるように溶かし、同様の測定を行った結果、ヘモグロビン定量、糖化ヘモグロビン定量共に検出限界以下であり、血清中のグロブリン成分の影響を回避してヘモグロビンが測定されている事が明白であった。

【0069】

【実施例6】

糖化アルブミンHPLC法と酵素法(本発明)の相関性

<R-1>	実施例4に同じ。
<R-2>	実施例4に同じ。
<基質溶液>	糖尿病患者血清 10検体 健常者血清 10検体
<操作>	操作は実施例4に同じ。

【0070】健常者及び糖尿病患者血清20検体を用い本発明に基づく酵素法と、公知のHPLC法の相関を確認した。尚HPLC法の測定は、糖化アルブミン計(GAA-2000; 京都第一科学社製)にて糖化アルブミン率を測定した。アルブミン糖化割合は実施例1記載のHSA をキャリブレーターとし、糖化アルブミン定量値／アルブミン定量値から算出した。結果本発明に基づく定量方法から得られる糖化アルブミン割合は、HPLC法糖化アルブミン率と、相関係数 r = 0.957 と非常によい相関を示し、本発明に基づく定量方法は糖化アルブミンを正確に定量していることが明らかとなった。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の実施例1に基づくHABA発色のpH依存性

を示す。

【図2】本発明の実施例1に基づくBCG 発色のpH依存性示す。

【図3】本発明の実施例1に基づくBCP 発色のpH依存性示す。

【図4】本発明の実施例2に基づくアルブミン発色変化に及ぼすプロテアーゼ濃度の影響示す。

【図5】本発明の実施例2に基づく糖化アルブミン測定

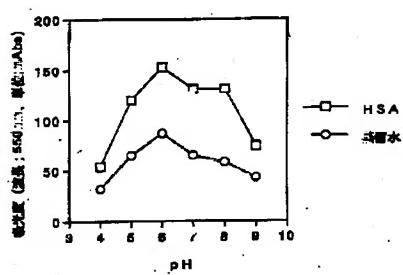
反応のタイムコース示す。

【図6】本発明の実施例3に基づく糖化アルブミン測定反応のタイムコース示す。

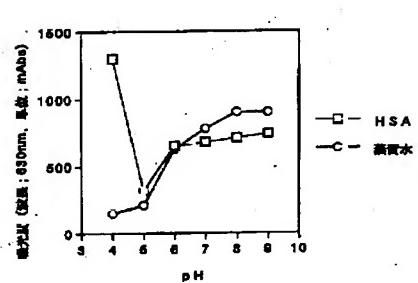
【図7】本発明の実施例4に基づくアルブミン、糖化アルブミンの定量曲線示す。

【図8】本発明の実施例5に基づくヘモグロビン、糖化ヘモグロビンの定量曲線を示す。

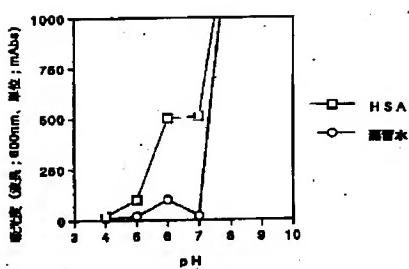
【図1】



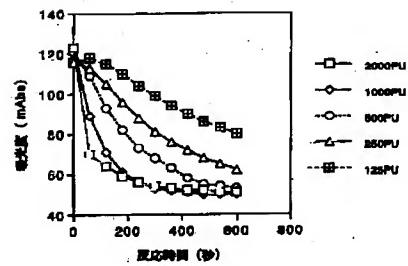
【図2】



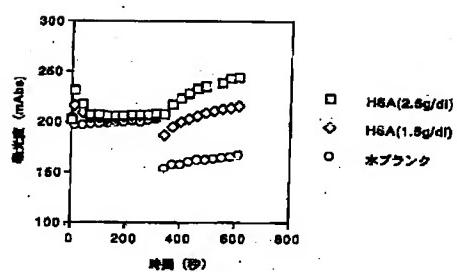
【図3】



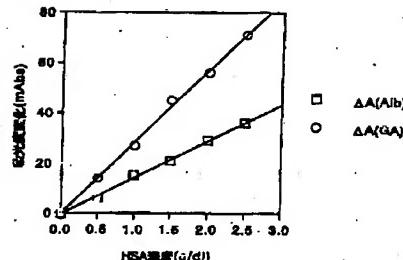
【図4】



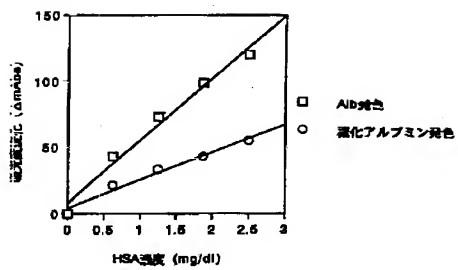
【図5】



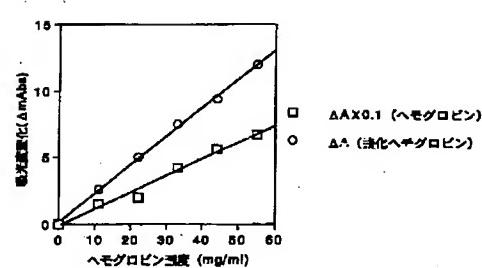
【図6】



【図7】



【図8】



フロントページの続き

Fターム(参考) 2G045 AA25 AA40 BA13 BB60 CA01
CA02 CA25 CA26 CB03 DA44
DA45 FA11 FA29 FB01 FB11
FB12 GC10 GC15
4B063 QA01 QA19 QQ03 QQ79 QQ80
QR03 QR16 QR41 QR52 QR66
QR67 QS20 QS28 QS36 QX01